



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE HOMBRES
INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITOURINARIA
OCASIONADA POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y
MYCOPLASMA SP. EFECTO DE LA TERAPIA ANTIBIÓTICA Y
ANTIOXIDANTE**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA CELULAR**

**PRESENTADA POR:
BENITO RAMOS GONZÁLEZ**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

**MARÍA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA
PEDRO JOAQUÍN DEL CASTILLO ESCASSI
JOSÉ JAVIER SÁNCHEZ HERNÁNDEZ**

Madrid, 2011

MARÍA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA
PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

CERTIFICA Que: Don BENITO RAMOS GONZÁLEZ, Licenciado en Químico Clínico Biólogo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado: **“Fragmentación del ADN espermático de hombres infértiles con infección genitourinaria ocasionada por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* Efecto de la terapia antibiótica y antioxidante”**, que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid a 13 de septiembre de 2011



Fdo.: MARIA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

PEDRO DEL CASTILLO ESCASSI, PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICA: Que Don Benito Ramos González, Licenciado Químico Biólogo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO DE HOMBRES INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITOURINARIA OCASIONADA POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y *MYCOPLASMA SP.* EFECTO DE LA TERAPIA ANTIBIÓTICA Y ANTIOXIDANTE”**, estudio original y que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 5 de septiembre de 2011

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'P. Del Castillo Escassi', is written over a horizontal line.

Fdo.: Pedro Del Castillo Escassi



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Preventiva salud pública y Microbiología

JOSÉ JAVIER SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA PREVENTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICA: Que Don Benito Ramos González, Licenciado Químico Biólogo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO DE HOMBRES INFÉRTILES CON INFECCIÓN GENITOURINARIA OCASIONADA POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y *MYCOPLASMA SP.* EFECTO DE LA TERAPIA ANTIBIÓTICA Y ANTIOXIDANTE”**, estudio original y que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 5 de septiembre de 2011

Fdo.: José Javier Sánchez Hernández

Dedicado a:

*El Dr. Eduardo Bustos Obregon, por ser un ejemplo de vida dedicada a la ciencia,
Inconsable formador de nuevos científicos,
Entrañable Profesor y Amigo.*

*A mi familia,
y en especial a Cristy*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Guadalupe Gallegos Ávila, Directora de la tesis y Profesora del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme apoyado e impulsado en la realización de la tesis, por compartirme su experiencia y por ser un ejemplo excepcional de trabajo.

Al Dr. Pedro del Castillo, Profesor de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, por su experta asesoría pero sobre todo por su disposición, por la confianza depositada en mí y por su gran calidad humana.

Al Dr. José Javier Sánchez Hernández, Profesor del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.M por el tiempo destinado a el análisis de esta tesis, por sus sabios consejos, por su inagotable paciencia y sobre todo por distinguirme con su amistad.

Al Dr. Jesús Áncer Rodríguez, Jefe del Departamento de Patología de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo constante, sin el cual esta tesis no podría haberse realizado.

Al Dr. Javier Regadera, con respeto y admiración por su profesionalismo y en especial por su gran labor de vinculación de la cual he sido beneficiado.

A Octavio Díaz, Salomón Álvarez, Alberto Niderhauser, Adriana Ancer, Laura Rodríguez y Claudia Sánchez, Profesores del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León por sus palabras de aliento y apoyo, que me llevaron a culminar este proyecto.

A Martha Martínez, Daniel Salas, Mauricio Morales, Bernardo de León, y Lucero Cabello, por haberme auxiliado en la realización de este documento, por haber generado un ambiente cálido de trabajo, por su simpatía, su sentido del humor, sus conversaciones enriquecedoras y agradables y por haber estado siempre disponibles cuando he necesitado de su valiosa ayuda.

A todos los miembros del Laboratorio SERTOLI AC, en especial a Joel Barrera y Rosy Rodríguez por su tiempo invertido en el manejo y custodia de las historias clínicas, en el envió, recepción y cuidado de las muestras biológicas incluidas en esta Tesis.

A todos los pacientes que aceptaron participar en este estudio, esperando que su aportación sirva para avanzar en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad.

Agradezco especialmente a mis padres María Isabel y Benito, por su amor y protección, y por ser mi motivación para la realización de cada uno de mis proyectos de vida.

A mis hermanos Myrna Isabel y Julio Cesar, por el apoyo incondicional recibido, por su comprensión y compañía.

En especial agradezco a Cristy, mujer que comparte conmigo proyectos, sueños, fracasos y alegrías; por su paciencia, por acompañarme en el difícil andar de nuestras vidas, por estar a mi lado... por todo.

INDICE

| | |
|---|------------|
| Lista de figuras..... | i |
| Lista de tablas..... | iv |
| Lista de abreviaturas..... | vii |
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1 Aspectos generales de las infecciones genitourinarias..... | 1 |
| 1.2 Bacterias relacionadas con la infertilidad del hombre..... | 3 |
| 1.3 <i>Chlamydia trachomatis</i>..... | 4 |
| 1.3.1 Antecedentes..... | 4 |
| 1.3.2 Taxonomía de <i>C. trachomatis</i> | 5 |
| 1.3.3 Características generales de <i>C. trachomatis</i> | 6 |
| 1.3.4 Estructura biológica..... | 7 |
| 1.3.5 Características genéticas de <i>C. trachomatis</i> | 8 |
| 1.3.6 Metabolismo y ciclo de vida..... | 9 |
| 1.3.7 Mecanismo de transmisión de <i>C. trachomatis</i> | 11 |
| 1.3.8 Inmunología y patogénesis..... | 11 |
| 1.3.9 Diagnóstico microbiológico..... | 12 |
| 1.3.9.1 Cultivo selectivo..... | 12 |
| 1.3.9.2 Detección directa del antígeno..... | 13 |
| 1.3.9.3 Fijación del complemento..... | 15 |
| 1.3.9.4 Detección directa con técnicas moleculares..... | 15 |
| 1.3.9.5 Técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos..... | 15 |
| 1.3.9.6 Reacción en cadena de la polimerasa o PCR..... | 16 |
| 1.3.10 Infecciones genitourinarias e infertilidad masculina ocasionada por <i>C. trachomatis</i> | 16 |
| 1.3.11 Susceptibilidad antibiótica..... | 19 |
| 1.4 <i>Mycoplasma sp.</i> y <i>Ureaplasma sp.</i>..... | 20 |
| 1.4.1 Taxonomía de las bacterias..... | 20 |
| 1.4.2 Características generales de <i>Mycoplasma sp.</i> y <i>Ureaplasma sp.</i> | 22 |
| 1.4.3 Estructura biológica..... | 23 |
| 1.4.4 Metabolismo y ciclo de vida..... | 24 |
| 1.4.5 Genoma y composición..... | 25 |
| 1.4.6 Detección de Micoplasmas y Ureaplasmas..... | 26 |
| 1.4.6.1 Cultivo microbiológico convencional..... | 26 |
| 1.4.6.2 Métodos comerciales para el diagnóstico de Micoplasmas y Ureaplasmas..... | 28 |
| 1.4.6.3 Diagnóstico Serológico de Micoplasma y Ureaplasma..... | 29 |
| 1.4.6.4 Detección molecular de Micoplasmas y Ureaplasmas..... | 29 |
| 1.4.7 Susceptibilidad antibiótica..... | 29 |
| 1.4.8 Infecciones genitourinarias e infertilidad masculina por <i>Mycoplasma sp.</i> | 31 |
| 1.5 Fragmentación en el ADN del espermatozoide..... | 34 |
| 1.5.1 Técnicas empleadas para la evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide..... | 38 |
| 1.6 Tratamiento antioxidante..... | 40 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 42 |

| | |
|---|----|
| 3. OBJETIVOS | 43 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| 4.1 Casos incluidos en el estudio | 44 |
| 4.1.1 Grupo de pacientes | 44 |
| 4.1.1.1 Criterios de Inclusión | 44 |
| 4.1.1.2 Criterios de Exclusión | 44 |
| 4.1.2 Grupo de Control | 45 |
| 4.1.2.1 Criterios de Inclusión | 45 |
| 4.1.2.2 Criterios de exclusión | 45 |
| 4.2 Número de pacientes, base de datos y confidencialidad | 45 |
| 4.3 Muestras biológicas | 46 |
| 4.4 Terapia Antibiótica y antioxidante | 47 |
| 4.5 Técnicas de laboratorio | 48 |
| 4.5.1 Análisis del líquido seminal | 48 |
| 4.5.2 Prueba de Inmunofluorescencia directa con anticuerpos Anti- <i>Chlamydia trachomatis</i> | 50 |
| 4.5.3 Cultivo para identificación de <i>Mycoplasma sp.</i> | 51 |
| 4.5.4 Examen citológico en fresco para la detección de Clamidia y Micoplasma | 52 |
| 4.5.5 Evaluación de la fragmentación del ADN | 52 |
| 4.6 Análisis estadístico | 54 |
| 4.6.1 Estadística descriptiva | 54 |
| 4.6.2 Estadística inferencial | 54 |
| 4.6.3 Análisis de supervivencia | 55 |
| 5. RESULTADOS | 56 |
| 5.1 Descripción clínica de los pacientes | 56 |
| 5.1.1 Información andrológica | 56 |
| 5.1.2 Información ginecológica | 58 |
| 5.1.3 Evaluación microbiológica | 61 |
| 5.2 Patología seminal y espermática: controles, pacientes y efecto del Tratamiento | 63 |
| 5.2.1 Análisis del líquido seminal | 63 |
| 5.2.1.1 Parámetros físico-químicos del líquido seminal | 63 |
| 5.2.1.2 Concentración de espermatozoides | 65 |
| 5.2.1.3 Motilidad espermática | 66 |
| 5.2.1.4 Vitalidad espermática | 69 |
| 5.2.1.5 Parámetros citológicos asociados a inflamación | 70 |
| 5.2.2 Morfología del espermatozoide y fragmentación de la cromatina espermática | 73 |
| 5.2.2.1 Morfología espermática | 73 |
| 5.2.2.2 Dispersión normal de la cromatina | 80 |
| 5.2.2.3 Dispersión anormal de la cromatina | 82 |
| 5.3 Comparación de variables modificadas por el tratamiento en función del embarazo | 85 |
| 5.3.1 Diagnóstico microbiológico | 85 |
| 5.3.2 Concentración de espermatozoides | 90 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.3 Motilidad espermática..... | 90 |
| 5.3.4 Vitalidad espermática..... | 92 |
| 5.3.5 Parámetros citológicos asociados a inflamación..... | 92 |
| 5.3.6 Morfología Espermática..... | 95 |
| 5.3.7 Dispersión normal de la cromatina del espermatozoide..... | 100 |
| 5.3.6 Dispersión anormal de la cromatina del espermatozoide..... | 102 |
| 5.4 Efecto del tratamiento sobre la patología ginecológica..... | 104 |
| 5.4.1 Cambios clínicos..... | 104 |
| 5.4.2 Concentración de bacterias en el exudado cérvico vaginal..... | 106 |
| 5.4.3 Recuperación de la fertilidad..... | 108 |
| 5.5 Identificación de parámetros de valor predictivo para el embarazo..... | 109 |
| 5.5.1 Análisis del tiempo hasta el embarazo..... | 109 |
| 5.5.2 Modelo multivariante de Cox (Tiempo al embarazo)..... | 111 |
| 6. DISCUSION..... | 112 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 139 |
| 8. RESUMEN..... | 140 |
| 9. SUMMARY..... | 142 |
| 10. REFERENCIAS..... | 144 |
| 11 ANEXO..... | 157 |

Lista de Figuras

- Figura 1. Taxonomía del orden Chlamydiales. Clasificación basada en las secuencias de los genes 16S y 23S RNA, Gen ompA, GroEL, KDO-transferasa y ompB. Figura creada para el desarrollo de la tesis basada en los trabajos de Herring, 1993; Storz y Kaltenboek, 1993; Everett, 1999; Bush y Everett, 2001 y Bergey 2010.
- Figura 2. Representación del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*. La membrana citoplasmática de la célula huésped (línea roja) muestra depleción durante el ingreso de la bacteria con la formación de vesículas endocíticas y posterior activación y división de los cuerpos de inclusión hasta formar cuerpos reticulares los cuales son eliminados tras 72 horas posterior a la entrada. Figura creada para la ilustración de la tesis (Cocchiari, 2009).
- Figura 3. Taxonomía de la Clase Mollicutes. Se muestra algunos de los géneros asociadas principalmente a infección en el humano. *Mycoplasma* y *Ureaplasma* frecuentemente son aislados de secreciones respiratorias y urogenitales. Figura fue creada a partir de los trabajos de Maniloff, J. 1992. Waites et al., 2004, Taylor-Robinson. 1984 y Bergeys 2010.
- Figura 4. Antecedentes Clínicos Andrológicos de los 70 pacientes infértiles incluidos en el estudio. La figura muestra los datos clínicos de frecuentemente reportados en los pacientes.
- Figura 5. Antecedentes diagnósticos clínico andrológicos de los 70 pacientes infértiles incluidos en el estudio. La figura muestra los antecedentes de mayor frecuencia referidos por los pacientes.
- Figura 6. Síntomas clínico-ginecológicos de mayor frecuencia registrados en la historia clínica de las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio.
- Figura 7. Antecedentes de patologías ginecológicas asociadas a la infertilidad registradas en las historias clínicas de las cónyuges de los pacientes infértiles.
- Figura 8. Detección de *C. trachomatis* con Anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína contrastados con Azul de Evans. En la figura de la izquierda se observa una célula epitelial de la uretra presente en el líquido seminal de paciente, se observan cuerpos elementales verdes sobre un fondo de contraste rojo (azul de Evans) el cual es afín a los restos del citoplasma.
- Figura 9. Diagnóstico de *Mycoplasma*. Identificación microbiológica de *Mycoplasma* sp. en líquido seminal de los pacientes infértiles, sistema de identificación bioquímica (MYCOPLASMA IST 2), Imagen izquierda superior: Identificación del cultivo positivo para *Mycoplasma* sp y *Ureaplasma urealyticum*. Imagen izquierda inferior: Identificación del cultivo positivo para *U. urealyticum*. La imagen de la derecha corresponde a colonias bacterianas de *Mycoplasma* sp. observadas a 1000x en microscopio de campo claro.
- Figura 10. Representación gráfica del comportamiento del volumen seminal de los pacientes infértiles en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 11. Representación gráfica de las variantes del color del líquido seminal registradas en las muestras de los pacientes incluidos en el estudio durante los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 12. Representación gráfica de las características de viscosidad seminal reportadas en las muestras de los pacientes incluidos en el estudio durante los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 13. Medición del pH del líquido seminal en el grupo de pacientes infértiles para los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 14. Concentración espermatozoides en el líquido seminal de pacientes infértiles registrada en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 15. Espermatozoides sin movimiento reportados en el líquido seminal de pacientes durante los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 16. Espermatozoides con movimiento in-situ en líquido seminal de pacientes en los diferentes ciclos de tratamiento.
- Figura 17. Espermatozoides con movimiento progresivo curvilíneo de los pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

- Figura 18. Espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo en los pacientes infértiles en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 19. Espermatozoides con movimiento progresivo total en los pacientes infértiles reportados en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Esfericidad de Mauchly ($W=0,875$; $p=0,02$), Corrección de Greenhouse-Geisser= 0,853, Potencia 94,5%.
- Figura 20. Vitalidad espermática del grupo de pacientes infértiles reportada en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Espermatozoides vivos (transparentes y sin contraste); espermatozoides muertos (color rojo). Microscopia de campo claro, 100x
- Figura 21. Vitalidad espermática reportada en el grupo de pacientes infértiles en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 22. Presencia de restos celulares en el líquido seminal de pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 23. Presencia de células redondas por campo microscópico reportadas durante el análisis de los parámetros citológicos del líquido seminal de pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 24. Cuantificación de leucocitos en el líquido seminal de los pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 25. Cuantificación de células fagocíticas presentes en el líquido seminal de los pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 26. Presencia de Células epiteliales en el líquido seminal de pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 27. Parámetros citológicos asociados a inflamación observados en el líquido seminal de pacientes infértiles con infección por Chlamydia y Mycoplasma. Observaciones en líquido seminal. A. Presencia de células redondas, tinción de rojo neutro. B. Detritus celulares, tinción de eosina amarilla. C. Leucocito peroxidasa positivo. D. Célula epitelial (izquierda) y macrófago (derecha) rojo neutro positivo. 1000x, Microscopio de campo claro.
- Figura 28. Morfología espermática normal y anormal registrada en los pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 29. Defectos de la cabeza del espermatozoide en pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico Esfericidad de Mauchly ($W=0,902$; $p=0,483$).
- Figura 30. Morfología espermática. Defectos de la cabeza del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por C. trachomatis y Mycoplasma sp. A. Espermatozoide piriforme B. Macrocéfalo C. Binucleado. Tinción de azul de metileno y verde brillante, 100x, Campo Claro.
- Figura 31. Alteraciones o defectos del núcleo del espermatozoide en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Esfericidad de Mauchly ($W=0,695$; $p=0,002$), factor de corrección de Greenhouse-Geisser= 0,823). $p=0,019$, Potencia del 74,1
- Figura 32. Morfología espermática. Defectos del núcleo del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por C. trachomatis y Mycoplasma sp. A y B Núcleos vacuolados C. Núcleo elongado y núcleo con cromatina descompactada. D y E. Núcleo esférico y núcleos de forma irregular y descompactado. Tinción de azul de metileno y verde brillante, 100x, Campo Claro.
- Figura 33. Defectos del acrosoma de los pacientes en diferentes ciclos de tratamiento. Esfericidad de Mauchly ($W=0,914$; $p=0,433$). ($p=0,001$), potencia al 93%
- Figura 34. Morfología espermática. Defectos del acrosoma del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por C. trachomatis y Mycoplasma sp. A. Espermatozoide biflagelado con pieza media gruesa y acrosoma ausente. B Espermatozoides con acrosomas disminuidos y flagelos gruesos. C. Espermatozoides con núcleo irregular y acrosoma disminuido (izquierda) y espermatozoide de acrosoma agrandado y vacuolado. D. Espermatozoides de núcleo degradado y vacuolado.
- Figura 35. Alteración de la pieza media del espermatozoide en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Esfericidad de Mauchly ($W=0,881$; $p=0,238$) $p<0,001$, Potencia 93%

- Figura 36. Morfología espermática. Defectos de la pieza media del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A. Espermatozoide con núcleos alterados y gota citoplásmica vacuolada. B Espermatozoide con acrosoma vacuolado y pieza media doblada. C. Espermatozoides con piezas medias engrosadas y defectos acrosomales. D. Espermatozoide con vacuolas nucleares y pieza media doblada.
- Figura 37. Alteraciones de la pieza principal del flagelo de los espermatozoides en diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 38. Morfología espermática. Defectos de la pieza principal del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A, B, C. Espermatozoides con flagelos enrollados, con bacterias adheridas y vacuolación del acrosoma. D. espermatozoides con defectos acrosomales y flagelos cortos.
- Figura 39. Alteraciones morfológicas de los espermatozoides relacionadas con lesión del núcleo en los diferentes ciclos de tratamiento. Prueba de esfericidad de Mauchly ($W=0,712$; $p=0,03$), factor de corrección de Greenhouse-Geisser= $0,806$. Potencia 80.8%
- Figura 40. Dispersión normal de la cromatina del espermatozoide en los pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 41. Halo de dispersión de la cromatina grande en los pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 42. Halo mediano de dispersión de la cromatina de los espermatozoides en los pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 43. Dispersión anormal de la cromatina de los espermatozoides de los pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 44. Espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina chico en pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 45. Espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina en pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante
- Figura 46. Espermatozoides con núcleo degradado en pacientes a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 47. Dispersión de la cromatina de los espermatozoides. Control (Izquierda), espermatozoides con halos normales de dispersión de la cromatina (g= grande; m= mediano). Pacientes (derecha) espermatozoides con diferentes halos de dispersión de la cromatina g=grande; m= mediano; ch= chico y sh= sin halo. Tinción de Wright, 100x, Campo claro
- Figura 48. Identificación de *C. trachomatis* mediante IFD aplicada a muestras de líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio. Comparación de los resultados en las 4 muestras analizadas.
- Figura 49. Presencia de cuerpos reticulares en el líquido seminal de los pacientes a diferentes tiempos de tratamiento.
- Figura 50. Presencia de cuerpos elementales en el líquido seminal de los pacientes a diferentes tiempos de tratamiento.
- Figura 51. Identificación microbiológica de *Mycoplasma* sp. en el líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio mediante la prueba de MYCOPLASMA IST2. Comparación de los resultados en las 4 muestras analizadas.
- Figura 52. Presencia de bacterias pleomórficas en el líquido seminal de los pacientes a diferentes tiempos de tratamiento.
- Figura 53. Comparación de la concentración de espermatozoides en el eyaculado de pacientes con y sin embarazo.
- Figura 54. Comparación de los resultados de vitalidad espermática aplicada a pacientes con y sin embarazo.
- Figura 55. Comparación del número de leucocitos peroxidasa positivos presentes en el líquido seminal de los pacientes con y sin embarazo.

- Figura 56. Comparación de la concentración de células fagocíticas rojo neutro-positivas presentes en el líquido seminal de los pacientes con y sin embarazo.
- Figura 57. Comparación de la morfología espermática entre grupo con embarazo y sin embarazo en los diferentes ciclos de tratamiento.
- Figura 58. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides con dispersión normal de la cromatina en el grupo con y sin embarazo.
- Figura 59. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides con halo de dispersión grande de la cromatina el grupo con y sin embarazo.
- Figura 60. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides con halo de dispersión mediano de la cromatina el grupo con y sin embarazo.
- Figura 61. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides con halo de dispersión chico de la cromatina el grupo con y sin embarazo.
- Figura 62. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina el grupo con y sin embarazo.
- Figura 63. Dispersión de la cromatina del espermatozoide. Comparación del valor porcentual de espermatozoides con núcleo degradado.
- Figura 64. Presencia e intensidad de las lesiones cervicales en las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio, previas y posteriores a los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidantes asignados.
- Figura 65. Presencia e intensidad de endometritis en las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio, previas y posteriores a los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante asignados.
- Figura 66. Presencia e intensidad de las secuelas cicatriciales en las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio, previas y posteriores a los ciclos de tratamiento antibiótico asignados.
- Figura 67. Presencia e intensidad de falla ovárica en las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio, previas y posteriores a los ciclos de tratamiento antibiótico asignados.
- Figura 68. Presencia e intensidad de C. trachomatis en las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio, previas y posteriores a los ciclos de tratamiento antibiótico asignados.
- Figura 69. Presencia e intensidad de Mycoplasma sp. en secreciones genitales femeninas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante.
- Figura 70. Representación gráfica del análisis de supervivencia expresado en meses hasta el logro del embarazo.
- Figura 71. Representación gráfica del modelo de supervivencia. Comparación del tiempo en el que ocurre el evento en el grupo de embarazo y no embarazo.

Lista de tablas

| | Ubicación |
|--|-----------|
| I. Antecedente de pérdida gestacional temprana en las cónyuges de los hombres infértiles incluidos en el estudio. | Texto |
| II. Antecedentes de tratamientos previos de reproducción asistida practicados en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. | Texto |
| III. Resultados de cultivo microbiológico para la identificación de Mycoplasma sp. en muestras de líquido seminal y en exudado cérvico vaginal. | Texto |
| IV. Parámetros del seminograma en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. | Anexo |
| V. Parámetros citológicos asociados a inflamación en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. | Anexo |
| VI-A Defectos de la cabeza del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en | Anexo |

los diferentes tiempos de tratamiento.

| | |
|--|-------|
| VI-B. Morfología de defectos de la cabeza. Modelo Lineal General. | Anexo |
| VII-A. Defectos Del núcleo del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento | Anexo |
| VII-B. Morfología de defectos del núcleo. Modelo Lineal General. | Anexo |
| VIII-A. Defectos del acrosoma del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. | Anexo |
| VIII-B. Morfología de defectos del acrosoma. Modelo Lineal General. | Anexo |
| IX-A. Defectos de la pieza media del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. | Anexo |
| IX-B. Morfología de defectos de la pieza media. Modelo Lineal General. | Anexo |
| X-A. Defectos de la pieza principal del flagelo del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. | Anexo |
| X-B. Morfología de defectos de la pieza principal. Modelo Lineal General. | Anexo |
| XI. Dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva de todos los valores. | Anexo |
| XII. Tiempo de tratamiento antibiótico y antioxidante expresado en semanas y administrado a los pacientes en los tres ciclos asignados. | Texto |
| XIII. Defectos de la morfología espermática relacionados a daño nuclear. Modelo Lineal General | Anexo |
| XIV-A. Concentración de cuerpos reticulares mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento | Texto |
| XIV-B. Concentración de cuerpos elementales mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento. | Texto |
| XV. Concentración de Bacterias pleomórficas analizadas mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento | Texto |
| XVI-A. Parámetros de líquido seminal en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Tablas de Contingencia. | Anexo |
| XVI-B. Parámetros de líquido seminal en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Tablas de Contingencia. | Anexo |
| XVII. Comparación de la motilidad espermática en función del embarazo. Pacientes del grupo con embarazo y sin embarazo. | Texto |
| XVIII. Parámetros citológicos asociados a inflamación para cada uno de los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Estadística descriptiva | Anexo |
| XIX. Efecto del tratamiento sobre la concentración de detritus celulares en función del embarazo. | Texto |
| XX. Efecto del tratamiento sobre la concentración de células redondas presentes en el líquido seminal de los pacientes en función del embarazo | Texto |
| XXI. Parámetros citológicos asociados a inflamación en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. | Anexo |
| XXII. Presencia de células epiteliales en pacientes con y sin embarazo a diferentes tiempos de tratamiento | Texto |
| XXIII-A. Alteraciones de la cabeza de los espermatozoides en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias | Texto |
| XXIII-B. Alteraciones de la cabeza del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva | Anexo |

| | |
|---|---------------------------|
| XXIV-A. Alteraciones del núcleo del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias. | Texto |
| XXIV-B. Alteraciones en el núcleo del espermatozoide en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva | Anexo |
| XXIV-C. Alteraciones en el núcleo del espermatozoide en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva | Anexo |
| XXV-A. Alteraciones del acrosoma del espermatozoide en función del embarazo a diferente tiempo de tratamiento. Comparación de medias. | Texto |
| XXV-B. Alteraciones en el acrosoma del espermatozoide en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva. | Anexo |
| XXV-C. Alteraciones en el acrosoma del espermatozoide en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva. | Anexo |
| XXVI-A. Alteraciones de la pieza media del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias. | Texto |
| XXVI-B. Alteraciones de la pieza media del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva. | Anexo |
| XXVII-A. Alteraciones de la pieza principal del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias. | Texto |
| XXVII-B. Alteraciones en la pieza principal del flagelo del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva. | Anexo |
| XXVIII-A. Dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras de pacientes con embarazo. Comparación en diferentes tiempos de tratamiento. Estadística Descriptiva. | Anexo |
| XXVIII-B. Dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras de pacientes sin embarazo. Comparación en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva. | Anexo |
| XXIX-A. Porcentaje de pacientes con lesiones ginecológicas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante. | Texto |
| XXIX-B. Porcentaje de pacientes con lesiones ginecológicas con diferentes grados de lesiones ginecológicas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante. | Texto |
| XXX-A. Presencia de bacterias en secreciones genitales femeninas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante | Texto |
| XXX-B. Concentración de bacterias en secreciones genitales femeninas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante | Texto |
| XXXI. Probabilidad de embarazo en función del tiempo de tratamiento | Análisis de supervivencia |
| XXXII. Variables de predicción de embarazo según el modelo multivariante de Cox | Texto |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| 10B | Agar Anaerobios 10B |
| A7 | Agar 7 |
| A8 | Agar 8 |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| <i>ADNasas</i> | Desoxiribonucleasas específicas de ADN que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster. |
| <i>anti-Hsp70</i> | Anticuerpos Anti Hsp |
| A-T | Adenina-Timina |
| ATP | Adenosintrisfosfato |
| <i>Bcl2</i> | B-cell lymphoma 2. Proteínas pro apoptóticas |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| CAT | Catalasa |
| CDC | Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica |
| CE | Cuerpo elemental |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CR | Cuerpo reticular |
| DBD-FISH | DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization |
| EAE | Embarazo anembriónico |
| EIA | Enzimo inmunoanálisis |
| ESHRE | European Society of Human Reproduction and Embryology |
| FIV | Fertilización <i>in vitro</i> |
| GLM | Modelo Lineal General |
| GPx | Glutación peroxidasa. |
| GR | Glutación reductasa |
| <i>GroEL</i> | Gen Codificante de Hsp60 |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HCl | Ácido Clorhídrico |
| <i>hctA</i> | Actin assembly-inducing protein |
| <i>hctB</i> | Actin assembly-inducing protein |
| <i>Hela</i> 229 | Línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical |

| | |
|-----------------------------|---|
| | (Henrietta Lacks) |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| HMR | Huevo muerto retenido |
| HR | Hazard Ratio |
| <i>Hsp</i> | Heat shock proteins |
| IC | Intervalo de confianza |
| ICSI | Inyeccion intracitoplasmática de espermatozoides |
| IF(C+/C-), | Immunofluorescencia (Control positivo/Control negativo) |
| IFD | inmunofluorescencia directa |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| ISNT | In Situ Nick Translation |
| kb | Kilobases |
| kDa | KiloDaltons |
| LPS | lipopolisacárido |
| Me | Mediana |
| mg/día | miligramos por día |
| MOMP | Major outer membrane protein |
| nm | Nanómetros |
| O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| OH- | Grupo Hidroxilo |
| <i>OmpI</i> | Major Outer Membrane Protein Gene |
| <i>OmpA</i> | Outer Membrane Protein A. |
| <i>ompB</i> | Outer Membrane Protein B. |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pH | Potential of Hydrogen |
| PHGPx | Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa |
| <i>PKcd</i> | Protein Kinase C |
| Q10 | Coenzima Q10 |
| rARN | Ácido ribonucleico ribosómico |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| SCD | Sperm Chromatin Dispersion |

| | |
|---------------|---|
| SCSA | Sperm Chromatin Structure Assay |
| SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| SP4 | Agar SP4 |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| TAAN | Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos |
| tARN | Ácido desoxirribonucleico de transferencia |
| TE | Tiempo de embarazo |
| TUNEL | Terminal <i>dUTP</i> Nick-End Labeling |
| U9 | Medio cultivo ureaplasma U9 |
| UCC/ml | Unidades cambiadoras de color por mililitro |
| UGA | Codón de terminación |
| <i>ureA</i> , | Genes de ureasa A |
| <i>ureB</i> | Genes de ureasa B |
| <i>ureC</i> | Genes de ureasa C |
| <i>ureD</i> | Genes de ureasa D |
| <i>ureE</i> | Genes de ureasa E |
| <i>ureF</i> | Genes de ureasa F |
| <i>ureG</i> | Genes de ureasa G |
| W | Esfericidad de Mauchly |
| WHO | World Health Organization |
| µm | Micrómetros |

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de las infecciones genitourinarias

Las infecciones del tracto genital representan un importante riesgo para la salud, particularmente en la población sexualmente activa y son causadas por microorganismos que normalmente forman parte del tracto reproductivo o que son introducidos desde el exterior durante el contacto sexual (OMS, 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud, todos los años se producen en el mundo más de 340 millones de casos nuevos de infección por bacterias y protozoos de transmisión sexual. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica (CDC), estima que cada día hay 19 millones de infecciones de transmisión sexual nuevas, casi la mitad de ellas en población de jóvenes menores de 25 años, siendo este fenómeno influenciado por factores sociales y económicos así como por la biología y el comportamiento del microorganismo (CDC, 2009).

Hace casi dos décadas, fue aceptada por la Organización Mundial de la Salud la asociación que existe entre las infecciones del tracto genital y las alteraciones del líquido seminal, estimándose en aquella época, una prevalencia del 10 al 20% de infección genital en hombres (WHO, 1992).

El diagnóstico y tratamiento de infecciones genitourinarias es esencial en la evaluación y manejo inicial de las parejas que sufren de infertilidad. Sin embargo, una gran proporción de los hombres con infecciones genitourinarias son asintomáticos, lo que genera un conflicto para la definición de una infección clínicamente significativa.

Algunos autores han publicado, en cuanto al hombre fértil o subfértil, que hay diferencias en el tipo y prevalencia de infección genitourinaria asociada, aunque la alteración de la función del espermatozoide suele ser con frecuencia secundaria a una epididimitis y a una próstato-vesiculitis crónicas (Keck *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1998). Otros autores no encontraron relación alguna entre la bacteriospermia y la afectación en la calidad del semen (Colpi *et al.*, 1989; Ness *et al.*, 1997).

El significado de la leucocitospermia en el líquido seminal es discutida, pero su presencia está considerada como un indicador de infección activa del tracto genital (WHO, 1992). Sin embargo, para el diagnóstico de leucocitospermia los resultados de los diferentes métodos para la detección de leucocitos, incluyendo la identificación citológica, las técnicas inmunocitoquímicas, marcaje con anticuerpos monoclonales, la

medición de especies reactivas de oxígeno y la prueba de leucoperoxidasa, se correlacionan poco entre sí (Aitken y Baker, 1995; Trum *et al.*, 1998).

La leucocitospermia, como un indicador de infección en hombres asintomáticos, tiene evidentes limitaciones. Cerca del 80% de las muestras con leucocitospermia son microbiológicamente negativas y en muchos hombres esta alteración seminal puede resolverse sin tratamiento (Yanushpolsky *et al.*, 1996).

Wolf (1998), en un estudio de 100 hombres con leucocitospermia encontró que en el 54% de las muestras las pruebas microbiológicas y serologías fueron negativas; mientras que, en el 25% de las muestras con leucocitospermia tenían anticuerpos *anti-chlamydia* y casi la mitad de los varones que tenían semen sin leucocitospermia presentaban el mismo hallazgo. Así mismo, otras bacterias patógenas incluyendo *Ureaplasma urealyticum*, *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma hominis*, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* se detectan con la misma frecuencia en hombres leucocitospérmicos y no leucocitospérmicos (Trum *et al.*, 1998; Chan y Schlegel, 2002).

Múltiples estudios han evaluado el efecto de la bacteriospermia sobre la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* (FIV) y han concluido que no existe un efecto directo, siendo la terapia antibiótica innecesaria (Claman *et al.*, 1996; Liveersedge *et al.*, 1996; Stovall *et al.*, 1993). Recientemente, Pacey y Eley (2004), publicaron que la adhesión de cuerpos elementales de *C. trachomatis* a la pieza media y flagelo del espermatozoide, difícilmente pueden ser eliminados utilizando técnicas convencionales de lavado de espermatozoides, contribuyendo a tasas de fertilización bajas en las técnicas de FIV.

Otras publicaciones, mencionan la asociación entre los anticuerpos IgA y antígenos de *C. trachomatis* en el líquido folicular, así como la expresión de la proteína *Hsp60* y el fracaso de las técnicas de FIV, apoyando la hipótesis de que una infección por Clamidia en el aparato genital superior contribuye al fracaso de esta técnica en algunas mujeres (Neur *et al.*, 1997; Sharara y Queenan, 1999).

Las infecciones constituyen, la patología más frecuentemente encontrada en el sistema reproductor masculino, incluyendo las glándulas accesorias (Weidner *et al.*, 1998; WHO, 2001; CDC, 2009). En hombres menores de 35 años, la epididimitis es generalmente de transmisión sexual, reconociéndose a la *C. trachomatis* como agente causal ampliamente aceptado (Krause y Bohring, 2003; González *et al.*, 2004).

En pacientes con epididimitis aguda también se pueden encontrar *U. urealyticum*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa* (Krieger y Riley, 2002). La infección del epidídimo puede ser el resultado de un ascenso retrógrado de bacterias

patógenas uretrales a través de los conductos eyaculadores y de los conductos deferentes (Gorpinchenko y Dobrovolskaia, 1997; Ward *et al.*, 1999).

Se considera que el inicio de la actividad sexual durante la adolescencia y la falta de medidas de profilaxis así como el tener varias parejas sexuales incrementa el riesgo de contraer infecciones, las cuales pueden comprometer la capacidad reproductiva de la pareja (Stevens-Simon y Sheeder, 2005).

La prevención y tratamiento de las infecciones genitourinarias ocasionadas por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* en la población sexualmente activa, constituyen uno de los aspectos más importantes para la disminución de complicaciones gineco-obstétricas e infecciones perinatales (Breeze, 2006). El carácter epidémico de estas infecciones y la dificultad para su control se deben a que un alto porcentaje de pacientes infectados permanecen sin tratamiento, por ser frecuentemente asintomáticas, y ser causadas por microorganismos poco evaluados (Howell *et al.*, 1998; Schachter y Grossman, 2001).

Sin embargo los serotipos de *C. trachomatis* que afectan la vía genital y los Micoplasmas genitales tienen directa afinidad por el epitelio columnar, siendo la uretra, endocérnix y el recto sitios preferentes de infección por estos microorganismos (Holmes *et al.*, 1999). Se considera de que en momento actual se dispone de datos concretos y suficiente evidencia que demuestra la influencia negativa de las infecciones subclínicas y la inflamación sobre el estatus de fertilidad del varón, así como su asociación con otros factores causantes de infertilidad o subfertilidad masculina (Diemer *et al.*, 2000).

1.2 Bacterias relacionadas con la infertilidad del hombre

Los cultivos microbiológicos aeróbicos y anaeróbicos pueden detectar un amplio espectro de bacterias patógenas urogenitales, aunque existen bacterias que sólo podrían identificarse mediante cultivos específicos y técnicas moleculares especiales (Martínez, 2001).

Existe un grupo amplio de microorganismos que son considerados patógenos del tracto genitourinario y que pueden aislarse en el líquido seminal, entre estos se encuentran: *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus ducreyi*, Herpes virus tipo I y II, Virus del Papiloma Humano y *Trichomonas vaginalis* (Schachter y Grossman, 2001). Otros autores han aislado en el semen de varones infértiles bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *C. trachomatis* y *M. genitalium*, aunque sin una asociación clara con la piospermia (Kjaergaard, *et al.*, 1997; Solís, *et al.*, 2000).

En las últimas décadas se ha registrado un incremento en las infecciones del tracto genital femenino y masculino por *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, estas bacterias provocan infecciones de tipo inespecífico que generalmente pasan inadvertidas manteniéndose ocultas por mucho tiempo y generando gradualmente una patología inflamatoria crónica de los órganos del aparato reproductor, lo que puede provocar infertilidad en el varón y otras secuelas patológicas en el testículo, en el epidídimo y/o en la vía espermática (Chan y Schlegel, 2002; Ford *et al.*, 2004; Trum *et al.*, 1998; Wiggins *et al.*, 2006).

1.3 *Chlamydia trachomatis*

1.3.1 Antecedentes

Los primeros informes acerca de la presencia de *Chlamydia sp.* en patologías infecciosas se deben a las descripciones sobre tracoma hechas hace miles de años en documentos antiguos como es el código de Hammurabi en China y en el Papiro de Hebers, Egipto. Estos últimos hacen una descripción de la enfermedad como “exudativa y productora de cicatrices en el ojo”.

En México Francisco Javier Clavijero Echegaray, Ilustre Jesuita Veracruzano refiere que en el siglo XVII trataban un padecimiento ocular cuyas manifestaciones clínicas coinciden con el tracoma. El tratamiento consistía en la eversión del párpado para frotar sobre la conjuntiva tarsal un cristal de sulfato de cobre tratando de eliminar los folículos. El Dr. Falk en 1872, hace mención a la presencia de tracoma en México y en 1887 se reconoce la presencia de conjuntivitis folicular tracomatosa en todo el territorio nacional (García *et al.*, 2008).

En 1906, los Austríacos Halbertaeder y Von Prowazek durante sus trabajos en la isla de Java, empleando la coloración de Giemsa, observaron cuerpos punteados intracitoplasmáticos en un frotis conjuntival de orangutanes previamente inoculados con material tracomatoso humano. Al ser estos cuerpos de gran tamaño, pensaron que se trataba de un protozooario confiriéndoles el nombre de *Chlamydozoaceae* (Baehr *et al.*, 1998 y Bavoil, 1990). En 1910 se confirmó la existencia de las mismas inclusiones en raspados del cérvix y en los años siguientes fueron descritas en células uretrales masculinas (citado por: García *et al.*, 2008).

En 1930, durante la gran epidemia de psitacosis europea, y principalmente en Alemania, Sir Samuel Bedson evidenció inclusiones intracitoplásmicas parecidas a las del tracoma a partir de los macrófagos de ratones inoculados por vía peritoneal con

esputo de pacientes afectados por neumonía grave y hacia 1940 se describen de nuevo inclusiones en células obtenidas por punción de ganglios hipertrofiados de pacientes con linfogranuloma venéreo (citado por: Fagundo, 2000). A finales de 1950, dos investigadores en Japón lograron reconocer los corpúsculos de *Chlamydia* utilizando la microscopia electrónica (citado por: Mandell, 1991).

En México, en la región de los Altos de Chiapas el tracoma es considerado endémico estando afectados las comunidades de Oxchuc, Chanal, Tenejapa, Huixtán y Cancuc. Este problema dio lugar a la creación del Instituto Mexicano de Oftalmología Tropical ubicado en el municipio de San Cristóbal de las Casas.

1.3.2 Taxonomía de *C. trachomatis*

Los miembros del orden *Chlamydiales*, son bacterias gram negativas intracelulares obligadas de células eucarióticas. Poseen ciclos de replicación característicos, con la alternancia de dos formas de diferenciación del microorganismo y comparten más del 80% de similitud en las secuencias de los rARN de 16S y 23S.

Mediante la secuenciación del 16S rARN se ha demostrado que existe una homología del 95% en las 4 especies de *Chlamydia* que están estrechamente relacionadas: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*. (Baehr *et al.*, 1998).

La antigua clasificación se complicó considerablemente al reconocerse tres nuevos grupos de bacterias: las cepas "Z" o *Simkania*, dos microorganismos aislados de amebas; *Parachlamydia* (Halls'coccus), *Neochlamydia Waddlia*, un agente aislado de un feto bovino abortado, e inicialmente clasificado como *Rickettsia*.

En 1999, Everett *et al.*, propusieron la nueva clasificación del orden *Chlamydiales*, la cual se basa en las características fenotípicas, rango de huésped, patologías asociadas y el análisis filogenético del operón ribosomal. Estudios filogenéticos efectuados con posterioridad y en los que se han incluido otros cinco genes han validado esta nueva clasificación (Martínez *et al.*, 2001).

En la década de 1980, *C. trachomatis* es reconocida como un patógeno genital responsable de una variedad de síndromes clínicos y es clasificado taxonómicamente en la familia *Chlamydiaceae* junto con el género *Rickettsia* (Bergeys, 2010).

Los Chlamydiales comprenden actualmente cuatro familias: *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* y *Waddliaceae*. Su taxonomía se representa en la Figura 1.

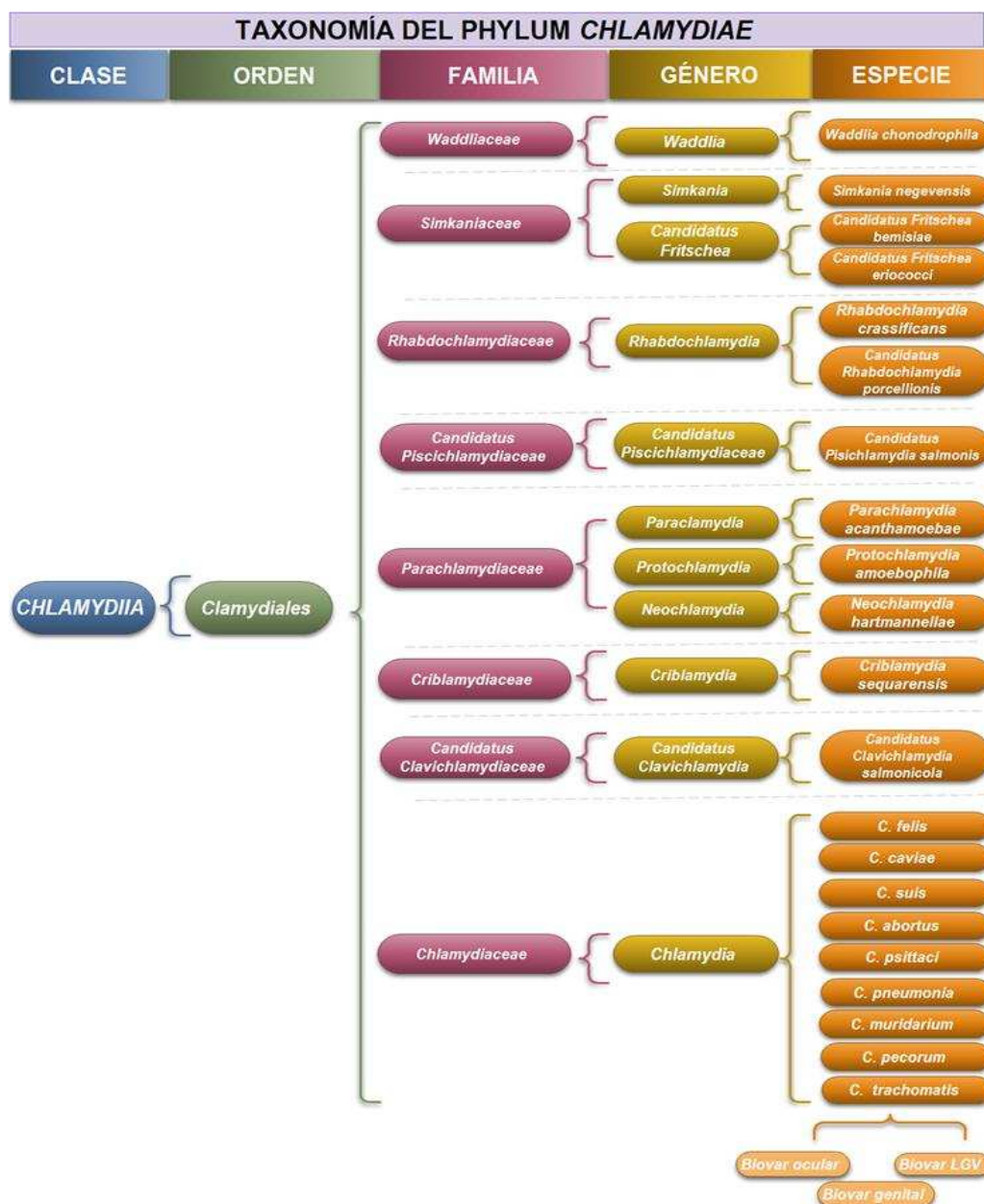


Figura 1. Taxonomía del orden Chlamydiales. Clasificación basada en las secuencias de los genes 16S y 23S RNA, Gen *ompA*, *GroEL*, *KDO-transferasa* y *ompB*. Figura creada para el desarrollo de la tesis basada en los trabajos de Herring, 1993; Storz y Kaltenboek, 1993; Everett, 1999; Bush y Everett, 2001 y Bergey 2010.

1.3.3 Características generales de *C. trachomatis*

La pared celular de *Chlamydia* es similar a la de las bacterias gram negativas, se reproducen por fisión binaria, y utilizan el ATP de la célula huésped para la síntesis de sus proteínas. Las especies de *Chlamydiaceae* son bacterias intracelulares obligadas de células eucarióticas con dos formas de vida distintas: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR).

Los CE son estructuras esféricas de tamaño pequeño, infecciosas, rígidas, resistentes a la ruptura debido a la presencia de puentes disulfuro de las proteínas de la

capa externa de la membrana. Los CE se liberan cuando se destruye la célula huésped infectada, su tamaño oscila entre 200 y 400 nm, con la tinción de Giemsa se tiñen de púrpura y de color rojo cuando se contrastan con la técnica de tinción de Macchiavello, en contraste con la coloración que toma el citoplasma de la célula huésped (Mandell *et al.*, 1995).

En los CE la mayor parte del ADN se encuentra en el nucleóide central electrodensó y la mayor parte del ARN está en los ribosomas. Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos, que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar y son infectivos.

Los CR son el resultado de la diferenciación de los CE, desprovistos del nucleóide denso y de tamaño aproximado entre 600 a 1000 nm, metabólicamente activos y no infecciosos. Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse y el ADN se encuentra disperso.

1.3.4 Estructura biológica

Todas las especies de *Chlamydia* presentan un antígeno común, asociado a la membrana celular y específico de género, el lipopolisacárido que es común a las tres especies, tiene actividad de endotoxina. Los anticuerpos frente a este antígeno son los primeros en aparecer ante una infección aguda primaria o secundaria.

En la membrana externa de *Chlamydia* se encuentra el complejo proteico de la proteína mayor de membrana externa (MOMP) que contiene los antígenos específicos de especie. La caracterización de estos antígenos se ha conseguido mediante microinmuno fluorescencia con anticuerpos monoclonales (Kuo *et al.*, 1995).

La membrana de *Chlamydia sp.* descrita en observaciones con técnicas de microscopía electrónica, muestra dos membranas celulares trilaminares, las cuales se caracterizan por la ausencia de peptidoglicanos, pero contiene proteínas de unión a las penicilinas. Se han realizado estudios en donde se ha demostrado que en el tratamiento con penicilina en células infectadas muestran inhibición de la división celular pero no del crecimiento del CR con la aparición de formas clamidiales morfológicamente anormales y agrandadas (Skilton *et al.*, 2009).

La membrana presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los CE para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Los CR son frágiles en comparación con los CE (Raulton, 1995; Martínez *et al.*, 2001).

Las proteínas de la envoltura de *Chlamydia sp.* ricas en cisteína incluyen:

1. Proteína MOMP, constituye el 60% del total de las proteínas de la membrana externa, tiene un peso molecular de 40 kDa y está codificada por el gen *omp1*; su función es de porina, se glicosila post-traduccion, participa en la adherencia electrostática y sus epitopes de superficie son antigénicos (Raulton, 1995; Martínez *et al.*, 2001; Cocchiari y Valdivia, 2009).
2. Proteína de 69 kDa: se encuentra en el espacio periplásmico, dando a las clamidias una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Es codificada por el gen *omp2* (Raulton, 1995; Martinez *et al.*, 2001; Cocchiari y Valdivia, 2009).
3. Proteína de 12-15 kDa: codificada por el gen *omp3*, es una lipoproteína hidrofílica que participa en la adhesión a las células huéspedes. Los CR no contienen esta proteína.

Algunos autores han confirmado la presencia de dos proteínas de shock térmico (*Hsp*) en la envoltura clamidial, la *Hsp60* y la *Hsp70*, en mujeres con enfermedad pélvica asociada a *C. trachomatis*. En estudios realizados sobre infertilidad y embarazos ectópicos se han observado títulos altos de anticuerpos *anti-Hsp60* clamidial, en contraste con la presencia de anticuerpos *anti-Hsp70* clamidial reportados en mujeres con inmunidad protectora (Raulton, 1998).

1.3.5 Características genéticas de *C. trachomatis*

C. trachomatis posee un genoma cromosómico pequeño constituido de 1.042.519 pares de bases (58,7% de A-T), y se caracteriza por tener un plásmido críptico de 7.493 pares de bases. Su genoma codifica aproximadamente para 894 proteínas de las cuales 70 son exclusivas de *C. trachomatis*. También posee genes que controlan la síntesis de triptófano relacionándose estos con la mediación del interferón gama en el desarrollo de infección persistente (Ostos y Mérida, 2003).

C. trachomatis posee genes análogos a otros en especies como *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, los cuales codifican proteínas que participan en la estructura, función y en los aspectos inmunológicos de la bacteria.

El gen *ompA* codifica proteínas de MOMP presentando gran homogeneidad genética entre distintos aislados de *C. pneumoniae*. En cambio la diversidad genética es mayor en *C. psittaci* y *C. trachomatis* por la existencia de dominios variables en estas

especies. El gen *ompB* codifica una proteína de 60 kDa rica en residuos de cisteína altamente conservados entre especies y con probable función estructural.

Otros genes presentes corresponden al gen *GroEL* y *DnaK* los cuales codifican las proteínas *Hsp*, proteínas con un importante papel en la inmunopatología de la infección. La *Hsp* de 60 kDa de *C. trachomatis* se ha asociado con la respuesta de hipersensibilidad retardada en infecciones crónicas. En contraste los anticuerpos contra la *Hsp* 70 kDa tienen actividad neutralizante (Belland *et al.*, 2003). El gen *GroEL* de *C. pneumoniae* tiene un 95 y 97% de homología con el gen *GroEL* de *C. trachomatis* y *C. psittaci*, respectivamente. El gen *DnaK* de *C. pneumoniae* presenta un 87% de similitud con *C. trachomatis* (Rivero, 2001).

Algunos de los genes para los que codifica *C. trachomatis* se encuentran relacionados al ciclo de crecimiento de la bacteria como es el caso de los genes *hctA* y *hctB*, estos codifican proteínas relacionadas con el proceso de diferenciación del CR a CE. Por otra parte *omcA* y *omcB* codifican para proteínas con alto contenido de cisteína las cuales participan en la de resistencia estructural de los cuerpos elementales (Belland *et al.*, 2003).

1.3.6 Metabolismo y ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. trachomatis* sigue un curso bifásico intracelular alternando formas de vida morfológica y funcionalmente distintas: 1) una forma intracelular que puede presentar actividad metabólica y replicativa conocida como cuerpo reticular o bien existir como un organismo latente y no replicativo conocido como cuerpo críptico y 2) el cuerpo elemental, una forma de vida extracelular metabólicamente inactiva, de tamaño aproximado de 300 a 400 nm, rígidos, de localización extracelular pero con capacidad infecciosa, replicativa y resistentes a agresiones físicas externas. (Kuo *et al.*, 1995; Rivero, 2001). Figura 2

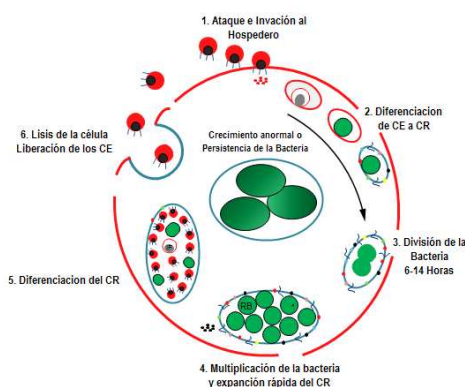


Figura 2. Representación del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*. La membrana citoplasmática de la célula huésped (línea roja) muestra depleción durante el ingreso de la bacteria con la formación de vesículas endocíticas y posterior activación y división de los cuerpos de inclusión hasta formar cuerpos reticulares los cuales son eliminados tras 72 horas posterior a la entrada. Figura creada para la ilustración de la tesis (Cocchiari, 2009).

El CE posee en su membrana celular abundantes puentes disulfuro que le confieren estabilidad en condiciones extracelulares (Newhall y Jones, 1983), también es capaz de resistir la acción oxidante del medio extra celular y de sobrevivir largo tiempo fuera de la célula huésped, pudiendo ser transmitido a nuevos huéspedes (Kuo *et al.*, 1995).

C. trachomatis después de su inoculación mediante secreciones contaminadas, se desplaza por mucosas húmedas y la infección se inicia con la adhesión del cuerpo elemental a la membrana de las células epiteliales de revestimiento de los conductos genitales a través de múltiples adhesinas y ligandos (Dautry-Varsat *et al.*, 2005).

Los CE penetran dentro de la célula huésped mediante endocitosis formando una invaginación en la pared celular (Wilson *et al.*, 2006). Una vez que han ingresado a la célula interceptan las vesículas que transportan lípidos y esfingolípidos provenientes del aparato de Golgi con dirección hacia la membrana plasmática, utilizándolas para su propio uso metabólico y para la renovación de la membrana del endosoma. La endocitosis requiere del citoesqueleto funcional de la célula huésped, pues la adición de citocalasina, un inhibidor de microfilamentos celulares, inhibe también el proceso de endocitosis clamidial (Cocchiario, 2009).

El CE se transforma a los pocos minutos en CR de mayor tamaño, pleomórfico, metabólicamente activo y que se replica por fisión binaria formando los cuerpos de inclusión citoplásmicos. El CR requiere del ATP y nutrientes celulares para su metabolismo y replicación, ya que no posee los mecanismos de glicolisis aerobia y es incapaz de sintetizar nuevos nucleótidos. (Moller, 1982; Schachter, 2001).

Este mecanismo de supervivencia de la bacteria conduce a la disminución del rendimiento energético del huésped limitando los propios mecanismos de biosíntesis. A medida que el CR se multiplica también se produce su condensación y en 2 a 4 días tras la endocitosis se produce la lisis celular y libera los nuevos CE al medio extracelular. Tras la lisis se produce la diseminación sistémica de *Chlamydia sp.* a distintos lugares donde puede permanecer en forma de infección latente. Esto ha dado lugar a especulaciones sobre la posible relación con enfermedades autoinmunes (Stratton y Mitchell, 1997).

C. trachomatis, ha desarrollado mecanismos únicos de adaptación, que le facilitan la entrada a la célula huésped, evadiendo los mecanismos de defensa celular contra la infección por la vía de inhibición de la apoptosis: bloquea la liberación de *Citocromo C* mitocondrial en base a la presencia de un factor con actividad de proteasa, que degrada proteínas anti-apoptóticas de la familia de *Bcl2*. La vaguedad de los síntomas en las

infecciones por *C. trachomatis* depende de una pobre respuesta inflamatoria, ya que ésta bacteria induce secuestro de la *proteín cinasa d* (*PKcd*) en el cuerpo de inclusión, lo que impide la activación de proteínas ligadas a la cascada de la respuesta inflamatoria (Buchholz y Stephens, 2007; Rajalingam *et al.*, 2008).

1.3.7 Mecanismo de transmisión de *C. trachomatis*

Según un estudio seroepidemiológico, realizado por Aldous y Cols (1992), en 68 familias para determinar la incidencia de infección aguda, encontraron que en todos los episodios de infección múltiple hubo miembros sin evidencia de infección. También se registró la falta de infecciones secundarias familiares, concluyendo que la diseminación del microorganismo no es fácil y quizá sólo unas pocas personas infectadas transmitan la bacteria o simplemente la respuesta inmunológica contra la bacteria no sea suficiente como para evidenciar la infección.

C. trachomatis es capaz de sobrevivir en aerosoles a temperatura ambiente y en condiciones de humedad alta, durante periodos cortos de tiempo por lo que la transmisión persona a persona es posible especialmente en situaciones de hacinamiento (Theunissen *et al.*, 1993).

Podemos resumir cinco posibles mecanismos de transmisión de la bacteria: 1) La vía del contagio sexual, 2) Transmisión de la bacteria por el canal de parto, 3) Por medio de aerosoles con la formación de pequeñas partículas (<10µm), 4). La inoculación directa por gotas o partículas grandes y 5) a través de fómites y superficies contaminadas. De todos estos mecanismos la vía de transmisión sexual es la más aceptada (Falsey y Walsh, 1990; CDC, 2009).

C. trachomatis puede permanecer viable de 12 a 30 horas en superficies sólidas y carentes de líquido, es posible la transmisión mano-mano desde las superficies contaminadas, aunque el inóculo transmitido sea escaso y la supervivencia se limita a 15 minutos. El portador asintomático y la excreción prolongada del microorganismo favorecen la transmisión (Falsey y Walsh, 1990).

1.3.8 Inmunología y Patogénesis

Las diferentes especies de *Chlamydia* pueden infectar de manera específica a las células eucarióticas dependiendo de su composición y de la afinidad con la bacteria. Cada serotipo de *C. trachomatis* es capaz de colonizar de manera diferente órganos y tejidos, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* son patógenos exclusivos en humanos,

mientras que *C. psittaci* produce infecciones intestinales y pulmonares en aves aunque sus excreciones son también infecciosas para el hombre.

La infección por *C. trachomatis* induce una respuesta inflamatoria a nivel celular, con afluencia de linfocitos, macrófagos, y células plasmáticas, también se desarrolla respuesta humoral con la producción de anticuerpos IgG, IgM e IgA (Morre *et al.*, 2000).

La eliminación total de las bacterias una vez que se ha establecido en el huésped es difícil de conseguir. En el caso del tracoma la infección ocular por *C. trachomatis* ocurre durante la infancia y sus complicaciones, opacificación corneal y retracción ocular, no suelen ser evidentes antes de los 40 años. Por estas razones la bacteria es considerada un organismo ampliamente prevalente, debido a la cronicidad de sus procesos patogénicos ya que da lugar a una respuesta inmune aberrante. (Straton y Mitchel, 1996).

1.3.9 Diagnóstico microbiológico

Existen diversos métodos para el diagnóstico de *C. trachomatis*, los cuales podemos clasificar en: procedimientos de cultivo celular, técnicas de detección de antígenos, métodos de hibridación de ácidos nucleicos y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). Estos procedimientos tienen distintos requerimientos de toma y transporte de muestras, en relación con las características de las técnicas a utilizar.

1.3.9.1 Cultivo selectivo

El aislamiento de *C. trachomatis* en líneas celulares *Hela* 229 y McCoy es el procedimiento que presenta una mayor especificidad para el diagnóstico de clamidia que llega al 100% y es considerado como *Gold Standard*. No obstante, por su baja sensibilidad, complejidad y los requerimientos de una cadena de frío para el mantenimiento de la viabilidad de *C. trachomatis*, no es recomendada como técnica de diagnóstico.

El cultivo en líneas celulares *Hela* 229 y McCoy para el aislamiento de *C. trachomatis* requiere de previa centrifugación del inóculo (1700g) y la adición de cicloheximida al medio de cultivo para inhibir el metabolismo de la célula huésped, y aumentar la recuperación de microorganismos viables. Para la detección de las inclusiones en los cultivos inoculados se utilizan anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluoresceína. Las tinciones con giemsa permiten ver las inclusiones en

un microscopio de campo claro, de una forma sencilla y barata, pero con falsos positivos para observadores poco expertos.

1.3.9.2 Detección directa del antígeno

Existen dos tipos de procedimientos para la detección de antígenos de *C. trachomatis*: la inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales y los enzimo inmunoanálisis (EIA). En esta segunda categoría se incluye una gran variedad de formatos como son los ensayos clásicos en microplaca, los ensayos automatizados y las pruebas rápidas. La técnica de IFD sigue siendo uno de los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico de *Chlamydia sp.* debido a que presenta una buena sensibilidad y especificidad.

La IFD es una técnica de diagnóstico rápida, pero precisa de la cuidadosa y experta observación microscópica y por ello no es adecuada para el procesamiento continuo de un gran número de muestras clínicas. En los países desarrollados donde el personal cualificado es caro, se utilizan preferentemente las técnicas de mayor automatización como EIA y las técnicas moleculares.

La IFD se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína principal de la membrana externa de *C. trachomatis*, *Omp1*, o al lipopolisacárido (LPS), o contienen una mezcla de los dos anticuerpos. La calidad de la tinción de los ensayos de IFD que contienen anticuerpos monoclonales con especificidad por el LPS es inferior, ya que la tinción de los CE se ve difuminada. Pero, además, algunos anticuerpos dirigidos al LPS, reconocen el LPS de otras bacterias gram negativas, por lo que sólo se recomienda el empleo de anticuerpos monoclonales anti *Omp1* (Forbes *et al.*, 1986; Sachse *et al.*, 2009).

Una de las ventajas de la IFD es que nos permite evaluar la calidad de la muestra debido al contenido celular. Una muestra inadecuada no contiene células epiteliales columnares ni de células escamosas. La sensibilidad de la IFD, en comparación con el cultivo celular, varía entre 80 y 90%, mientras que la especificidad fluctúa entre 94 y 99%. Los valores más altos de sensibilidad son observados en poblaciones con alta prevalencia de infección por clamidias y en población sintomática.

En comparaciones hechas en poblaciones con baja prevalencia de infección y en personas asintomáticas, se ha demostrado un escaso número de CE por preparado citológico inferior a 10, lo que reduciría la sensibilidad de la técnica (Schachter, 1985; Forbes, 1986).

Los métodos inmunoenzimáticos, que emplean anticuerpos mono o policlonales frente a lipopolisacáridos son: rápidos, automatizados, permiten procesar un número grande de muestras y eliminan la subjetividad del observador. Sin embargo la detección de antígeno de *C. trachomatis* con anticuerpos específicos ha mostrado una pobre sensibilidad (Sachse, 2009).

El inmunoensayo indirecto basado en el principio “sándwich”, por el cual se detecta la presencia en el suero de anticuerpos específicos dirigidos contra un antígeno que está fijado en una fase sólida (portaobjetos de vidrio, plástico o una membrana de celulosa), y al que se unen tras un periodo de incubación formando complejos antígeno anticuerpo. Posteriormente, tras un lavado para retirar los anticuerpos que no se hayan unido, se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana marcados con un fluorocromo que nos permitirán detectar por microscopía los complejos que se hayan formado en la primera fase.

Los EIA clásicos como Chlamydiazyme® (Abbott, USA), Microtrak® (Syva, E.U.A.) y CHLAMYDIA DIRECT IF® (BioMerieux, Francia) incluyen un reactivo de confirmación de las muestras positivas y su especificidad varía actualmente entre 98 y 100%, en comparación con el cultivo celular. En contraste, la sensibilidad de los EIA es inferior a la del cultivo.

Newhall y colaboradores en 1999 compararon en un estudio multicéntrico, varios procedimientos de diagnóstico inmunológico en el formato de EIA e IFD para la evaluación de 4980 muestras cervicales, en una población con baja prevalencia de infección. Mientras la especificidad de los procedimientos, luego de efectuar ensayo confirmatorio varió entre 99,6 y 99,8%, las sensibilidades de las técnicas fluctuaron entre 61,9 y 74,5%. La IFD (Microtrak®, Syva) fue la técnica más sensible. Entre las técnicas de EIA, EIA Syva fue la más sensible, 70,6%, mientras que EIA Sanofi y EIA Abbott tuvieron valores de sensibilidad de 61,6 y 61,9% respectivamente.

Las pruebas rápidas son técnicas diseñadas para emplear en la consulta de atención primaria, como apoyo al diagnóstico clínico y son buenas herramientas para screening a nivel de consulta primaria (Martínez, 2009). Al proporcionar resultados inmediatos estas técnicas permiten indicar tratamientos inmediatos, disminuyendo la pérdida de pacientes. Sin embargo, su especificidad es inferior a la de los técnicas convencionales y dado que la prevalencia en laboratorios de atención primaria es baja o moderada, tienen bajo valor predictivo positivo (Swain, 2004).

1.3.9.3 Fijación del complemento

Esta técnica detecta anticuerpos específicos de género, dirigidos contra el LPS, el cual es responsable de la reacción específica de género y por lo tanto puede dar lugar a reacciones cruzadas entre especies de *Chlamydia* o *Chlamydophilas*, por lo que ésta técnica no es útil para el diagnóstico de reinfecciones al no distinguir entre infección aguda e infección persistente.

Es necesario la presencia de un nivel mínimo de anticuerpos o una seroconversión para establecer un diagnóstico serológico de infección, así como la detección de las tres clases de anticuerpos IgG, IgM e IgA si queremos distinguir entre las distintas presentaciones de infección; aguda, reinfección o reactivación, infección crónica o persistente e infección antigua (Eikman, 1993).

1.3.9.4 Detección directa con técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular son utilizadas para la detección directa de los microorganismos difíciles de cultivar o detectar como la *C. trachomatis*. Se han empleado ensayos de hibridación con sondas marcadas, pero la sensibilidad es baja y su costo es muy elevado, la técnica más utilizada es la amplificación de los ácidos nucleicos (TAAN).

1.3.9.5 Técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos

Las TAAN son los procedimientos de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis* en virtud de su sensibilidad y especificidad y porque no requieren de la toma de muestras invasoras para su ejecución. Se ha demostrado que las TAAN detectan entre 17 y 28% más infecciones que otros procedimientos de diagnóstico (Martínez, 2009).

Existen varias tecnologías comerciales de TAAN, siendo los más conocidos la reacción de polimerasa en cadena, la reacción en cadena de la ligasa y la amplificación por desplazamiento de hebra. Se han presentado en algunos kits diagnósticos que detectan simultáneamente a *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*. No obstante estos procedimientos cuando se trabajan con valores predictivos positivos menores del 90% pueden generar resultados falsos positivos (CDC, 2009).

1.3.9.6 Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

La PCR detecta microorganismos que han dejado de ser viables durante el transporte, y permite además detectar microorganismos no cultivables durante una infección persistente. Se han utilizado varios oligonucleótidos específicos de la secuencia genómica de *C. trachomatis* tanto en la amplificación simple como en la reamplificación. Las dianas genómicas empleadas incluyen secuencias del ARN ribosómico 16S, el gen *omp1* del complejo MOMP, el gen de la MOMP de 60 kDa, rica en cisteína y secuencias codificadas de función desconocidas. La PCR tiene una alta especificidad respecto al cultivo y una sensibilidad que oscila en torno al 99,8%.

La detección positiva sin que exista infección activa es uno de los inconvenientes de la técnica. Esto puede afectar a la especificidad diagnóstica de la técnica al dar valor diagnóstico a un hallazgo que no lo tiene. La detección positiva en muestras, sin respuesta clínica acompañante, puede indicar sólo colonización, o bien infección crónica, en lugar de ser la causa primaria del cuadro clínico presente. En las infecciones más superficiales como es el caso de la uretritis o proctitis, puede faltar la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* y ser positivo el aislamiento de la bacteria.

La técnica PCR tampoco puede distinguir organismos muertos de organismos vivos después de un tratamiento antibiótico, pero la detección de ARN mensajero, mediante la técnica de la transcriptasa inversa-PCR indicaría actividad metabólica (Khan *et al.*, 1996).

La técnica de PCR es un procedimiento complejo, costoso y cuando no se estandariza en los laboratorios se dificulta su empleo para el diagnóstico a gran escala. Además la PCR puede dar falsos negativos por la presencia de inhibidores de la amplificación como moco y sangre y de *ADNasas* en la muestra (Rivero, 2001).

1.3.10 Infecciones genitourinarias e infertilidad masculina ocasionada por *C. trachomatis*

C. trachomatis es la bacteria más frecuentemente encontrada en las infecciones de transmisión sexual en países industrializados, responsable de más de tres millones de personas infectadas cada año en los Estados Unidos de América (Paavonen y Eggert-Kruse, 1999; OMS, 2006; Morré y Peña, 2009).

La organización mundial de la salud estima en 92 millones los casos nuevos de infección detectados anualmente en todo el mundo y es una de las principales causas de la sub-fertilidad en hombres y mujeres (González *et al.*, 2004; Hosseinzadeh *et al.*,

2004; Veznik *et al.*, 2004). *C. trachomatis* ha generado un problema de salud pública de proporciones epidémicas.

Desde finales de la década de 1980 se reconoce a *C. trachomatis* como la causa más importante de las alteraciones de la reproducción humana, siendo el microorganismo que más frecuentemente se transmite por vía sexual (Pavoneen y Wolner-Hanssen, 1989; Westrom, 1990; Pavoneen y Eggert-Kruse, 1999).

En hombres, *C. trachomatis* es responsable de 50% de las uretritis no gonocócicas y la mayoría de las uretritis post gonocócicas. Recientemente, la mayor parte de los cuadros de uretritis son considerados como la manifestación de agudización de las infecciones genitourinarias crónicas y asintomáticas, que pueden ubicarse en cualquier punto de la vía espermática, en la extensa superficie de las glándulas accesorias, en el epidídimo, incluso, en el testículo (Schiefer, 1998).

Chacko *et al.*, (2004), reportó una prevalencia de infecciones ocasionadas por *C. trachomatis* en un 27% en población adolescente de entre 14 a 17 años de edad en Estados Unidos de Norteamérica, mientras que Gdoura *et al.*, (2001) reportan 35,9% en hombres y 38% en mujeres sexualmente activas. En México no existen datos respecto a la incidencia de infecciones ocasionadas por *C. trachomatis*, pero existen algunos estudios que muestran una prevalencia del 12,9% en la ciudad de Durango en población adulta sexualmente activa (Vázquez *et al.*, 1998); en 1996 y 1997 en la ciudad de México se reportó una prevalencia de 20% (Leyva *et al.*, 1999), y nuestro grupo en el 2001, en un estudio realizado en 173 pacientes con infertilidad primaria o secundaria, se observó que el 73% de casos fueron positivos para *C. trachomatis* (Ramos y Gallegos, 2001).

Las próstato-vesiculitis clamidiales, que constituyen aproximadamente un tercio de las infecciones inespecíficas o no bacterianas de éstas glándulas, son generalmente crónicas, permanecen asintomáticas durante mucho tiempo, alteran la calidad seminal y el potencial de fertilidad del varón y requieren un tratamiento antibiótico que, en la mayoría de los casos, debe prolongarse por varios meses (Weidner *et al.*, 1998). *C. trachomatis* además es la mayor causa de uretritis y epididimitis no gonocócicas así como prostatitis crónica (Cunningham y Beagley, 2008).

En hombres homosexuales, el recto es el sitio común de infección por *C. trachomatis*; estas infecciones generalmente son asintomáticas, pero pueden causar síntomas característicos de proctitis, como son las descargas rectales y el dolor durante

la defecación, también pueden causar cuadros de proctocolitis (Schachter y Grossman, 2001; Quint *et al.*, 2011).

Hori y Tsutsumi (1995), demostraron la existencia de antígenos de *Clamidia* detectados por tinción de inmunoperoxidasa en tejidos de pacientes con epididimitis aguda y crónica, demostrando y confirmando el ascenso de la bacteria por el tracto reproductor masculino. Por otra parte múltiples estudios han demostrado la presencia de *C. trachomatis* en pacientes con uretritis y epidídimo-orquitis (Bruce *et al.*, 1981; Ibrahim *et al.*, 1996; Dale *et al.*, 2001).

Las infecciones de la vía seminífera presentan síntomas clínicos como uretritis, disuria y piuria, sin embargo, más del 40% de los hombres infectados con *C. trachomatis* afirmaron no presentar ningún síntoma (Ford *et al.*, 2004).

Se ha publicado que *C. trachomatis* es uno de los gérmenes presentes en los casos de infertilidad masculina y aunque no se conocen los mecanismos por los que este germen deteriora la fertilidad del hombre, se ha confirmado su capacidad de adherencia y penetración al citoplasma del espermatozoide (Wolner-Hanssen y Mardh, 1984; Erben, 1993).

El efecto de la infección por *C. trachomatis* en los parámetros espermáticos tradicionales no es clara, y los limitados estudios son discutibles. Veznik *et al.*, (2004), afirma que existe una influencia negativa en concentración, motilidad y morfología espermáticas, Hosseinzadeh *et al.*, (2004), no llegaron a la misma conclusión. Por otra parte, Jungwirth *et al.*, (2003), evidencian una ligera reducción en la capacidad para lograr reacción acrosomal inducida en espermatozoides de hombres con infección por *Chlamydia sp.* En cambio, Vigil *et al.*, (2002), detectaron fijación normal de los espermatozoides a la zona pelúcida y de condensación nuclear normal en la prueba de penetración de ovocitos de hámster. Por último, Idahl *et al.*, (2004), informaron de una asociación entre la presencia de anticuerpos contra clamidia en hombres asintomáticos, a pesar de no haber una clara influencia sobre los parámetros seminales clásicos, con una reducción de la posibilidad de lograr un embarazo.

Algunos autores han descrito, inclusiones bacterianas intracitoplásmicas de 200 a 300 nm de diámetro, de contenido electrodens y membrana plasmática ondulante en el interior de las células epiteliales endocervicales descamadas, en los estereocilios de células epididimarias, en gotas residuales del espermatozoide, en tejido conectivo del testículo y en células de Leydig (De Borges y Carvalho, 1987; Villegas *et al.*, 1991).

Knight *et al.*, (1987), estudiaron las características ultraestructurales de *C. trachomatis* en fibroblastos de ratón (células de McCoy) infectadas y no infectadas, y describieron la presencia de cuerpos elementales y cuerpos reticulares característicos del ciclo vital de la *C. trachomatis*.

También se ha detectado esta bacteria utilizando microscopia electrónica de transmisión analizando los espermatozoides del semen de pacientes infértiles, habiéndose descrito cuerpos elementales adheridos en pieza intermedia, cuello, cabeza y citoplasma espermático (Wolner-Hanssen y Mardh, 1984; Erbeni, 1993; Bragina *et al.*, 2001; Gallegos, *et al.*, 2009).

Erbeni (1993), presentó evidencias no sólo de la presencia de cuerpos elementales de *C. trachomatis* adheridos al espermatozoide, sino también de la internalización de la bacteria al flagelo, acrosoma y núcleo de espermatozoide, mediante un mecanismo de endocitosis, sin la participación de fagosomas o lisosomas. Este mismo autor describió también cómo la membrana plasmática de la *C. trachomatis* se fusiona a la del espermatozoide, formándose así una nueva membrana y la posterior multiplicación de la bacteria.

1.3.11 Susceptibilidad antibiótica

Debido a las características patofisiológicas y el curso crónico de las infecciones por Clamidia, al número elevado de casos nuevos a nivel mundial y su recurrencia es de gran interés el entendimiento y estudio de la susceptibilidad antibiótica de esta bacteria. La falta de métodos de laboratorio estandarizados para evaluarla en cultivos celulares es una limitante para el entendimiento de la terapia adecuada y para el manejo de pacientes con infección.

En la práctica clínica no es posible distinguir entre una autoinfección y una infección externa cuando se trata de Clamidia. Las infecciones recurrentes suceden debido a la reinfección ocasionada por la falta de tratamiento antibiótico eficiente. Estudios recientes sugieren que aún con el uso de terapia antibiótica apropiada que pretenda erradicar la infección se corre el riesgo de llegar a una persistencia por tolerancia antibiótica resultado de la exposición prolongada (Dean *et al.*, 2000; Munday, 1995)

Hasta antes del 2004 no se habían presentado resultados de estudios acerca del aislamiento de cepas de *C. trachomatis* a partir de pacientes con fracaso del tratamiento que muestren una resistencia estable a los agentes antimicrobianos recomendados para

la terapia o acerca de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas. Sin embargo Misyurina y cols. en 2004 publicaron haber aislado en 4 muestras de pacientes bacterias en las que se demostró la resistencia a macrólidos debida a mutaciones en el gen 23S rARN. La determinación de la susceptibilidad antibiótica de *C. trachomatis* es un procedimiento que aún no ha sido estandarizado. De igual manera la identificación genética de las mutaciones que dan resistencia a los macrólidos aún no han sido completamente esclarecidas (Wang *et al.*, 2005).

Los tratamientos antibióticos que alcanzan altas concentraciones intracelulares son los que mejor actividad presentan frente a *Chlamydia sp.* Por lo que el uso de macrólidos, tetraciclinas y algunas quinolonas son efectivos para el tratamiento y erradicación de la bacteria.

La terapia antibiótica sugerida contra las infecciones del tracto urogenital ocasionadas por Clamidia recomiendan el uso de doxiciclina o azitromicina. Ambos tratamientos han mostrado resultados satisfactorios en la eliminación de los síntomas clínicos. Sin embargo la erradicación de la infección no es completa (Dreses-Werringloer *et al.*, 2001).

La azitromicina es el tratamiento más ampliamente prescrito para las infecciones ocasionadas por *C. trachomatis* y es recomendado también para los casos de prostatitis crónica en conjunto con la doxiciclina y los macrólidos (Katz *et al.*, 1998; Bragina *et al.*, 2001). Sin embargo se ha publicado la existencia de reinfecciones a los pocos meses después del tratamiento.

Se ha aislado *C. trachomatis* a partir de secreciones urogenitales resistentes a la azitromicina (Somani *et al.*, 2000) y también se han publicado estudios *in vitro* acerca de la resistencia antibiótica de *Chlamydia sp.* a las fluoroquinolonas y rifampicinas (Dessus-Babus *et al.*, 1998; Dreses-Werringloer *et al.*, 2001).

1.4 *Mycoplasma sp.* y *Ureaplasma sp.*

1.4.1 Taxonomía de las bacterias

Los Micoplasmas (Orden *Mycoplasmatales* y Familia *Mycoplasmataceae*), forman un grupo de microorganismos procariotas de 190 especies distintas, son las bacterias autoreplicantes más pequeñas y simples; contienen un conjunto mínimo de organelos esenciales para el crecimiento y replicación: una membrana plasmática, ribosomas y un genoma consistente en una molécula circular de ADN de doble hebra. A diferencia de

todos los procariotas, los micoplasmas no tienen pared celular y consecuentemente están clasificados en una clase separada, los *Mollicutes* (*mollis*: suave; *cutes*: piel).

Dieciséis especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* pueden afectar como patógenos oportunistas a los humanos, estos han podido ser identificados y asociados en algunas enfermedades, las especies más conocidas son: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, *Ureaplasma parvum* y *U. urealyticum*.

M. amphoriforme es una especie identificada recientemente la cual juega un papel patogénico en la enfermedad humana y se encuentra actualmente bajo investigación (Waites y Talkington, 2005).

Micoplasmas y Ureaplasmas fueron clasificados en un *Phylum* independiente de bacterias *Mollicutes* gram negativas, sin embargo el análisis de rARN reveló que son similares a las bacterias gram positivas, ahora están clasificadas como bacterias gram positivas en el *Phylum Firmicutes*, sin embargo aparecen de color rosa tenue cuando se tiñen con la tinción de gram (Bauman, 2007).

U. parvum y *U. urealyticum* fueron considerados como una sola especie con una subdivisión de dos biotipos. En 2002, después de un prolongado debate, se acordó que el ex *U. urealyticum* se debe dividir en dos especies es decir, *U. parvum* y *U. urealyticum* (Kong y Gilbert, 2004). *U. parvum* contiene serotipos 1, 3, 6 y 14, mientras que *U. urealyticum* contiene los serotipos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (Schelonka y Waites, 2007).

Genes de ureasa se han encontrado en estas bacterias, como es el caso de *ureA*, *ureB*, *ureC* los cuales forman parte de la unidad estructural de la ureasa mientras que *ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG* son responsables de las proteínas accesorias.

Aunque estos genes se encuentran dentro de serotipos distintos, existen diferencias fundamentales en sus distribuciones entre *U. parvum* y *U. urealyticum* los cuales se pueden utilizar para distinguir las dos especies (Waites et al., 2004). La figura 3 muestra la clasificación taxonómica de los *Mollicutes*.

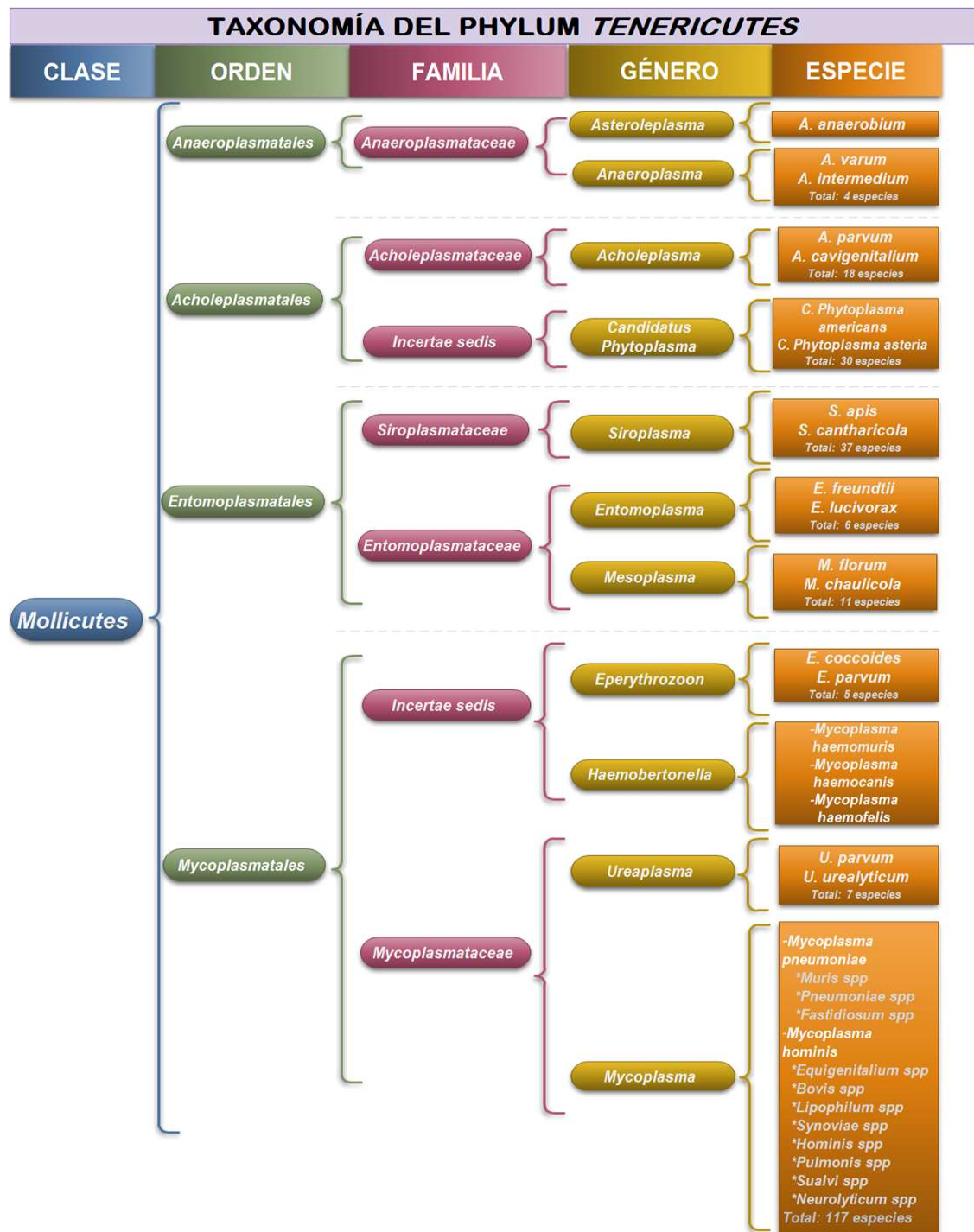


Figura 3. Taxonomía de la Clase Mollicutes. Se muestra algunos de los géneros asociados principalmente a infección en el humano. *Mycoplasma* y *Ureaplasma* frecuentemente son aislados de secreciones respiratorias y urogenitales. Figura fue creada a partir de los trabajos de Maniloff, J. 1992. Waites et al., 2004, Taylor-Robinson. 1984 y Bergeys 2010.

1.4.2 Características generales de *Mycoplasma* sp. y *Ureaplasma* sp.

Los Micoplasmas y Ureaplasmas son microorganismos pleomórficos no móviles que carecen de pared celular y están entre los microorganismos más pequeños de vida independiente. Estas bacterias son parásitos de un gran número de huéspedes, incluyendo humanos, animales, insectos, plantas y células en cultivo (Maniloff *et al.*,

1992; Chalker, 2005). Los Micoplasmas producen infecciones frecuentes en los cultivos celulares por lo que han sido denominados *crabgrass* (ladillas de la hierba), estos además son frecuentes, difíciles de detectar y de eliminar (Razin, 1994).

La forma básica de los Micoplasmas en cultivo es el “coccus”, este presenta un diámetro de entre 100 y 850 nm. En la mayoría de los cultivos aparecen en forma alargada y filamentosa (100 μm de largo y 0,4 μm de ancho). Los Micoplasmas se dividen por fisión binaria pero la división citoplasmática frecuentemente puede tener lugar después de la replicación genómica, resultando en la formación de filamentos multinucleados.

Estas bacterias pueden ser observadas a través de microscopía de contraste de fases, como partículas libres o asociadas en colonias, de forma esférica, pleomórfica o filamentosa (Maniloff, 1992).

Algunos Micoplasmas se caracterizan por presentar organelos de anclaje tal es el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma penetrans* en los cuales el filamento de anclaje aparece en forma de punta localizado en uno de sus extremos. Algunos Micoplasmas patógenos humanos exhiben movilidad en superficies cubiertas de líquido pero el organelo de anclaje siempre dirige el movimiento, lo cual indica su importancia en la unión al epitelio (Seto *et al.*, 2005).

Durante su desarrollo en medios de cultivo bifásico, estas bacterias se caracterizan por el crecimiento de sus colonias en forma de huevo frito: consta de una zona central densa de crecimiento que penetra el agar y una zona periférica que permanece sobre el agar.

1.4.3 Estructura biológica

Los Micoplasmas carecen de pared celular así como de membranas intracitoplasmáticas lo cual facilita su separación en una forma relativamente simple. Su membrana está compuesta, al igual que la de otros procariotas, por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos los cuales son parecidos a los de otros procariotas excepto por el gran contenido de colesterol (esteroles) que requieren para su crecimiento.

Las proteínas de la membrana expuestas en la superficie celular son los principales determinantes antigénicos de estas bacterias. Su membrana tiene un grosor de entre 7,5-10 nm de grosor sin distinción de pared celular, sin embargo algunas especies presentan una capa extramembranosa de 20 a 30 nm de espesor. Esta capa está

compuesta de carbohidratos (manosa, galactosa y glucosa), ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol (Maniloff, 1992).

1.4.4 Metabolismo y ciclo de vida

El modo de reproducción de los Micoplasmas no es diferente del resto de los procariontes, estos se dividen por fisión binaria y para que esto ocurra debe ser completamente sincronizada con la replicación del genoma, en el caso especial de estas bacterias la división del citoplasma puede retrasarse a la del genoma generando segmentos filamentosos multinucleados. Estos se transforman en cadenas de cocos con la constricción de la membrana a lo largo del filamento, lo cual ocurre en pocos minutos.

Los Micoplasmas suelen encontrarse en la superficie de los tejidos, pero también se ha demostrado su presencia dentro de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos (Marshall *et al.*, 1995). *M. fermentans* se ha encontrado en el interior de células no fagocíticas en pacientes con SIDA, en el caso de *M. penetrans* se sabe que presenta habilidad para ingresar a una variedad amplia de células humanas en condiciones *in vivo* e *in vitro* (Gil *et al.*, 2009).

El hábitat principal de los Micoplasmas en el humano son las superficies mucosas de las vías respiratorias y urogenitales y de las articulaciones en algunas especies animales. Aunque algunos Micoplasmas pertenecen a la flora normal, muchas especies son patógenas y causan enfermedades que tienden a seguir un curso crónico.

La mayoría de los Micoplasmas que infectan a los humanos y otros animales son considerados parásitos de la superficie. La adherencia es lo suficientemente firme como para evitar la eliminación de los parásitos a través de secreciones mucosas o en la orina.

El mecanismo de ingreso a las células puede estar mediado por receptores de superficie de la membrana ligados a clatrina, una vez que se unen en estos receptores las bacterias pueden ser endocitadas e ingresar en forma de vesículas membranosas, promoviendo cambios en el citoesqueleto, agregación de tubulina, α -actinina y condensación de proteínas fosforiladas, estas señales inducen reordenamientos específicos del citoesqueleto (Razin y Yogev, 1998).

La fusión de la membrana bacteriana con la del huésped altera la composición y la permeabilidad de la célula huésped y permite la introducción de enzimas hidrolíticas del parásito al interior del huésped. La íntima asociación entre la membrana de los Micoplasmas y la células hospedera proporciona un entorno en el que las

concentraciones locales de metabolitos tóxicos excretadas por el parásito se acumulan y causan daño a los tejidos (Waites y Talkington, 2004).

Entre los posibles mecanismos de daño de los Micoplasmas pudiesen estar los productos del metabolismo bacteriano, como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que resulta de la respiración de la bacteria, y corresponde a un factor patogénico responsable de la oxidación de los lípidos de la membrana, el incremento de radicales peróxido (O_2^-) y la acumulación de malonaldehído (Waites y Talkington, 2004).

1.4.5 Genoma y composición

El genoma de los Micoplasmas es típicamente el de células procarióticas y consiste en una molécula circular de ADN de doble hebra. Los genomas de los Micoplasmas están caracterizados por un bajo contenido de G+C (24 a 32%) distribuida de manera desigual a lo largo del genoma y por la utilización de codones que contengan Adenina o Uracilo en tercer posición. Otra característica importante es el uso del codón universal de *stop*, UGA como codón para el triptófano en *M. genitalium* y *M. penetrans* (Razin, 1985).

Los genomas de los Micoplasmas son los más pequeños de los procariotas autoreproducibles, con rangos que van desde los 600 a 2200 kb. En el caso de *M. genitalium* de 580 kb y de 1380 kb el de *M. mycoides*. Esta variación en tamaño no solo está presente en miembros del mismo género sino también en miembros de la misma especie y es debida a la presencia de elementos repetidos consistentes en segmentos de genes que codifican a proteínas y a la presencia de elementos de inserción. *Mycoplasma sp.* y *Ureaplasma sp.* son considerados las especies filogenéticas más recientes de los *Mollicutes* (Razin y Yogev, 1998).

En su molécula de ADN hay muy pocos genes, en algunos se estiman números menores a 500, lo cual lo ubica diez veces menor a *Escherichia coli*. Así, los Micoplasmas carecen de algunas actividades enzimáticas y rutas metabólicas, por lo que sus requerimientos nutricionales son complejos, haciéndolos dependientes de un modo de vida parasitario.

En el caso de *Mycoplasma genitalium*, el análisis de la secuencia en su genoma ha revelado la presencia de un único gen implicado en la biosíntesis de aminoácidos y de pocos precursores de vitaminas y ácidos nucleicos. *M. genitalium* mantiene los genes esenciales para la replicación de ADN, para la transcripción y para la traducción, pero

tiene un número reducido de genes rARN, tARN, factores de transcripción y proteínas reguladoras (Fraser *et al.*, 1995).

A pesar de poseer una membrana rica en colesterol carece de los genes implicados en su biosíntesis. Se explica así, la presencia de un elevado número de transportadores de membrana que compensarían la ausencia de enzimas metabólicas. En su genoma también encontramos genes relacionados con la adhesión celular y regiones implicadas en la variación antigénica que le permiten adherirse a la célula huésped y evadir el sistema inmune, respectivamente.

1.4.6 Detección de Micoplasma y Ureaplasma

La dependencia de los Micoplasmas a su huésped para la obtención de nutrientes explica el elevado nivel de dificultad en el cultivo de estos microorganismos en un laboratorio. Los medios necesarios para el cultivo de los Micoplasmas incluyen sueros que proveen ácidos grasos y colesterol para la síntesis de membrana.

La glucosa y otros carbohidratos metabolizables pueden ser utilizados como fuente de energía por los Micoplasmas fermentativos, los cuales poseen la ruta glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas. La mayoría de estas bacterias poseen, aunque truncado, un sistema respiratorio terminado en flavin, que desempeña la fosforilación oxidativa, generando finalmente ATP. La degradación de arginina por la ruta de la arginina-deshidrolasa ha sido propuesta como fuente principal de ATP en los Micoplasmas no fermentativos como es el caso de *M. hominis* (Miles, 1992).

Los Ureaplasmas tienen un requerimiento único entre organismos vivos, la urea, siendo no glicolíticos y carecen de la ruta de la arginina deshidrolasa, el ATP es generado a través de un gradiente electroquímico producido por el amonio liberado durante la hidrólisis intracelular de urea por ureasa (Neyrolles *et al.*, 1996).

1.4.6.1 Cultivo microbiológico convencional

El diagnóstico de Micoplasmas y Ureaplasmas se ve dificultado en los laboratorios clínicos convencionales debido a que no son fácilmente visualizados por los métodos de tinción de rutina y además crecen poco o nada sobre los medios de cultivo convencionales. Debido a la ausencia de una pared celular, los Micoplasmas son muy susceptibles a condiciones ambientales adversas como el secado, el cambio osmótico, metabolitos tóxicos y las fluctuaciones extremas del medio ambiente como la temperatura.

Los medios de cultivo diseñados específicamente para el aislamiento y crecimiento de *Mycoplasma* resultan costosos y de difícil aplicación a la población abierta, además su formulación única permite el crecimiento de todas las especies.

Los componentes de los medios de cultivo diseñados para el aislamiento de *Mollicutes* incluyen suero animal (bovino y fetal de caballo), peptonas, extracto de levadura, sustratos metabólicos (glucosa, cisteína, arginina y urea) y un indicador de pH (rojo fenol). Las condiciones anaeróbicas son necesarias cuando se trabajan caldos de cultivo, mientras que en medios que contienen agar se requiere la adición de 5-10% de CO₂, con una temperatura de incubación de 35-37°C (Duffy y Waites, 2008).

A consecuencia del genoma reducido de los *Micoplasmas* y *Ureaplasmas* y a la pérdida de enzimas implicadas en las rutas metabólicas de biosíntesis, se requieren medios complejos como el caldo y agar SP4. Para *Micoplasmas* genitales y *Ureaplasmas* es necesario el uso de medios como el A8 y A7, con caldo 10B y U9 para *Ureaplasma sp.* se recomienda la adición de arginina para el favorecimiento de *M. hominis*. Antibióticos como penicilina, cefoperazona, ampicilina y nistacina pueden ser incorporadas en los medios para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes.

A pesar de usar medios ricos como el SP4, 10B y U9 se demora hasta 2 semanas en generar las características colonias en forma de huevo frito, de 100 a 400 µm de diámetro, generando cambios de color en el medio dependiendo de la especie bacteriana aislada. Las colonias de *Ureaplasma sp.* que crecen en A8 presentan aspecto color café en su superficie debida a la actividad de la ureasa en presencia del indicador CaCl₂ contenido en el agar (Waites *et al.*, 2004).

Ureaplasma urealyticum produce hidrólisis de la urea y libera amonio el cual alcaliniza y produce cambios en la coloración en los caldos de cultivo (de amarillo a rosa). Estos cambios deben ser examinados dos veces al día durante 7 días, debido a que puede ocurrir agotamiento de urea en el medio y llevar a la muerte a las bacterias (Pinna *et al.*, 2006).

Los medios de cultivo para el aislamiento e identificación de las diferentes especies de *Mycoplasma*, son procedimientos que requieren de tiempo para su desarrollo, equipos y materiales, espacio físico y entrenamiento del personal. Para emitir un diagnóstico es necesario un mínimo de 5 semanas (Waites and Talkington, 2004; Daxboek *et al.*, 2003).

1.4.6.2 Métodos comerciales para el diagnóstico de Micoplasmas y Ureaplasmas

El desarrollo de los medios de cultivo preparados comercialmente y el de los kits de diagnóstico ofrecen alternativas más sencillas para la detección de *Mycoplasma sp.* y *Ureaplasma sp.* en las muestras respiratorias y urogenitales. Estos kits de diagnóstico requieren de laboratorios certificados para realizar el control de calidad interno por lo que se requiere tomar en cuenta estas limitaciones cuando se hace el diagnóstico (Waites *et al.*, 2003; Duffy y Waites, 2008).

Los medios de cultivo comercialmente preparados y disponibles en la actualidad son: El caldo arginina (*M. hominis*) y caldo U9 (*Ureaplasma sp.*) [Bio-Rad], mientras que los kits de diagnóstico disponibles para la identificación bioquímica y de susceptibilidad antibiótica son: MycoDuo (Bio-Rad); Mycoplasma IST2 (BioMérieux), Mycoview (Ivagen) y Pneumofast kit para la identificación de *M. pneumoniae*.

En el caso de Mycoplasma Duo kit (Bio-Rad), la identificación de la bacteria es posible debida a los cambios de color en el medio de cultivo (de amarillo a rosa) basados en el metabolismo de urea y arginina. Los resultados son evidentes entre 24 y 48 horas después de la inoculación. Este método permite la identificación de *Ureaplasma sp.* y *M. hominis*.

Cheah *et al.*, en el 2005, comparó la reacción en cadena de la polimerasa y el Mycoplasma Duo Kit en aspirados endotraqueales de neonatos encontrando una correlación del 96% de las muestras analizadas.

Mycoplasma IST2 (BioMérieux), este medio de cultivo permite la identificación y susceptibilidad antibiótica de *Ureaplasma sp.* y *Mycoplasma hominis*. La prueba de susceptibilidad incluye 9 antibióticos en dos diferentes concentraciones, este kit incluye antibióticos como la ciprofloxacina, la claritromicina, la azitromicina, entre otros. Con el uso de este método diagnóstico es posible obtener resultados falsos positivos cuando en las muestras se aísla *Proteus sp* y *Klebsiella sp*, las cuales son capaces de hidrolizar la urea (Biernat-Sudolska *et al.*, 2006).

El kit Mycoview (Ivagen), es una prueba que permite la identificación y valoración diferencial de *U. urealyticum* y *M. hominis* en muestras urogenitales. Esta prueba se basa en la resistencia natural y las propiedades metabólicas de estas bacterias: *U. urealyticum* es resistente a la lincomicina e hidroliza la urea, *M. hominis* es resistente a la eritromicina e hidroliza la arginina. El crecimiento de las dos especies se visualiza mediante un cambio en el color del material de color amarillo-naranja a rojo o rosa.

1.4.6.3 Diagnóstico serológico de *Mycoplasma* y *Ureaplasma*

El diagnóstico serológico es una herramienta importante en la práctica de diagnóstico de laboratorio de rutina para la identificación de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* (Daxboek *et al.*, 2003). Actualmente se encuentran disponibles numerosas pruebas serológicas para el diagnóstico de estas bacterias e incluyen: la prueba de fijación del complemento, la prueba de aglutinación de micropartículas y varias pruebas basadas en el análisis inmunoenzimático (Daxboek *et al.*, 2003; Loens *et al.*, 2003).

Una de las desventajas más importantes asociados con las pruebas serológicas, es que la sensibilidad depende del momento preciso en el que la muestra serológica sea obtenida, el diagnóstico confiable se basa en el análisis de dos muestras serológicas obtenidas en dos tiempos diferentes durante la enfermedad (McDonough *et al.*, 2005).

1.4.6.4 Detección molecular de *Micoplasmas* y *Ureaplasmas*

Aunque el método de cultivo es considerado la prueba *Gold Estándar* para la detección de estas bacterias, tiene la desventaja de no poder diferenciar con facilidad y en el menor tiempo posible las colonias de *Micoplasmas* y *Ureaplasmas* (Pinna *et al.*, 2006).

Estudios hechos por Nelson *et al.*, (1998), en muestras biológicas analizadas inmediatamente después de su recolección, demostraron que la técnica de PCR es más sensible que el cultivo microbiológico convencional. Propone que durante el parto, el neonato es capaz de infectarse de *Ureaplasma sp.* el cual con el tiempo puede incrementar su concentración. Un rápido diagnóstico por PCR podría beneficiar el diseño temprano de protocolos de tratamiento antibiótico.

Secuencias del gen 16S rARN y del 16S rARN–23S rARN (regiones de espaciado intergénico), el gen de la ureasa y el gen del antígeno de múltiple banda 5' terminal, han sido utilizados en las técnicas de PCR (Blanchard, 1990; Cordova *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 1993).

Varios oligonucleótidos han sido diseñados para la identificación de *Micoplasmas* y *Ureaplasmas* los cuales identifican diferentes áreas del gen 16S rARN (Cordova *et al.*, 2000).

1.4.7 Susceptibilidad antibiótica

Los tratamientos antibióticos dirigidos a inhibir la síntesis de la membrana, resultan poco efectivos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Micoplasmas* y

Ureaplasmas, ya que su mecanismo consiste en bloquear los sitios de unión para las enzimas bacterianas participantes, inhibiendo directamente a estas últimas, o bien, impidiendo el transporte y la reactividad de las moléculas precursoras. Una característica importante de los Micoplasmas y Ureaplasmas es que carecen de pared celular, por lo que estos tratamientos no son recomendados.

Antibióticos como los macrólidos, lincosamidas, ketólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas, comúnmente son utilizados como tratamiento contra infecciones ocasionadas por *Mycoplasma* y *Ureaplasma* en humanos. Se ha comprobado que las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos, experimentando mutaciones puntuales en su ADN cromosómico, mediante conjugación (recibiendo plásmidos o transposones de resistencia) o adquiriendo otros elementos génicos transmisibles adquiridos de otros microorganismos (Dancer *et al.*, 2003).

Mycoplasma hominis es resistente a 14 macrólidos y a 15 ketólidos pero ha mostrado susceptibilidad a josamicina y a 16 macrólidos y lincosamidas diferentes (Pereyre *et al.*, 2002).

En el caso de las infecciones en las que *Ureaplasma sp.* participa durante el embarazo y en los recién nacidos, los macrólidos son comúnmente utilizados para el tratamiento de estos padecimientos (Pereyre *et al.*, 2007).

Las tetraciclinas son utilizadas para el tratamiento de las infecciones del tracto genitourinario particularmente en la uretritis no gonocócica y en la enfermedad inflamatoria pélvica, sobre todo cuando los Micoplasmas y Ureaplasmas están implicados en el padecimiento. Otros antibióticos utilizados contra estas infecciones son las fluoroquinolonas que incluyen a la ciprofloxacina, ofloxacina y gatifloxacina (Waites y Talkington, 2004), también se ha sugerido el uso de nuevos fármacos como la esparfloxacina, gemifloxacina, gerenfloxacina y la moxifloxacina (Babear, 2008).

Se han desarrollado técnicas de gradientes de difusión en agar para determinar la susceptibilidad antibiótica de los Micoplasmas a las fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos, debido a que durante el aislamiento en medios sólidos de cultivo no es posible utilizar métodos convencionales como almohadillas impregnadas con antibióticos por el tamaño reducido de las colonias. Estas nuevas técnicas de gradiente no son ampliamente utilizadas debido a las características de desarrollo de la bacteria (Ngan *et al.*, 2004).

Los medios comerciales utilizados para el aislamiento e identificación de los Micoplasmas incluyen pruebas de sensibilidad antibiótica como en el caso de SIR

Mycoplasma Kit (Bio-Rad) y Mycoplasma IST 2 (Biomerieux) ambas pruebas contienen paneles con diferentes concentraciones de antibióticos.

Micoplasmas y Ureaplasmas genitales han mostrado resistencias a algunas quinolonas y macrólidos debida a la presencia de transposones localizados en algunos genes de estas bacterias (Bebear y Kempf, 2005). Beeton y cols. en el 2009 reportaron la resistencia de algunas cepas de Micoplasma y Ureaplasma al uso de tetraciclinas en países con prevalencias altas de estas infecciones en el manejo de parejas con infecciones de transmisión sexual (Beeton *et al.*, 2009).

1.4.8 Infecciones genitourinarias e infertilidad masculina por *Mycoplasma sp.*

A partir de que Dienes y Edsall en 1937 comunicaron la presencia de Micoplasmas en el tracto genital humano, se ha incrementado notoriamente el interés por estos microorganismos como causa de infección genitourinaria e infertilidad.

De las diferentes especies de Micoplasma que se han encontrado en el tracto genitourinario destacan *U. urealyticum* y *M. hominis* los cuales han sido sujetos a muchos estudios debido a su potencial patogénico, aunque recientemente el *M. genitalium* ha ido asumiendo mucha importancia.

Bacterias de la especie *Mycoplasma* fueron aisladas hace más de 30 años en un hombre que padecía uretritis no gonocócica (Shepard, 1970). Al poco tiempo se puntualizó que este germen se relacionaba no sólo con infección genitourinaria, sino con secuelas devastadoras sobre la infertilidad, aborto espontáneo y el nacimiento de niños con bajo peso (Kundsinn, 1976; Gnarpe y Friberg, 1972).

La dificultad que ha existido para la aceptación generalizada de *Mycoplasma sp.* como bacteria responsable de producir enfermedad, deriva de que no pueden ser fácilmente aislados de los sitios afectados, este es el caso de la trompa uterina, donde su diagnóstico se basa en evidencias serológicas; también es otra dificultad añadida el que frecuentemente se encuentren en individuos asintomáticos. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que estos organismos desempeñan un importante papel en enfermedades del tracto genital superior, tanto en mujeres como en hombres (Taylor-Robinson, 1984).

M. genitalium fue aislado por primera vez en 1981 en dos pacientes que mostraban síntomas de uretritis no gonocócica (Tully *et al.*, 1981). Desde entonces más de 20 estudios han demostrado la clara asociación entre *M. genitalium* y la uretritis en hombres (Horner *et al.*, 1993; Jansen, 2004). También se ha visto una clara correlación

entre infección de *M. genitalium* y enfermedades como la endometritis, salpingitis y la inflamación pélvica en mujeres (Cohen *et al.*, 2002).

Generalmente estas infecciones del tracto urogenital están ligadas a múltiples agentes etiológicos como *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Herpes simplex*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Escherichia coli*. A pesar de ello, estudios epidemiológicos demuestran que *M. genitalium* tiene una prevalencia similar a la de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (Goydos *et al.*, 2009).

Con la aplicación de técnicas de PCR, se ha podido demostrar que *M. genitalium* es uno de los agentes causales de uretritis no gonocócica aguda y crónica; no obstante, se ha aislado no sólo del tracto genitourinario y mucosa rectal, sino también del tracto respiratorio. En la mujer no se asocia con vaginitis, pero sí con cervicitis, endometritis y salpingitis (Taylor-Robinson, 2002).

Svenstrup *et al.*, en el 2003, examinó mediante microscopía óptica el ataque de *M. genitalium* a células espermáticas, encontrando que esta bacteria tras 5 minutos de incubación se une firmemente a la pieza media y a la cabeza del espermatozoide.

La asociación de *U. urealyticum* con infecciones genitales se ha venido documentando desde hace años. En humanos, se ha encontrado *U. urealyticum* en orina y cálculos de pacientes con litiasis e infección, y con menor frecuencia en los pacientes con litiasis metabólica, sugiriendo una posible asociación causal. Igualmente *U. urealyticum* se ha aislado del aspirado epididimario en pacientes con epidídimo-orquitis no gonocócica y no clamidial (Horner *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2002).

M. hominis se ha aislado del tracto urinario superior en pacientes con pielonefritis aguda, por lo que se sugiere como causa del 5% de los casos de pielonefritis, siendo potenciales factores predisponentes la obstrucción e instrumentación del tracto urinario (Taylor-Robinson, 2002).

Fowlkes *et al.*, en 1975, demostraron la presencia de *U. urealyticum* (entonces denominados como *Micoplasmas T*), en 625 hombres con infertilidad de etiología desconocida, encontrando diferencias significativas en la calidad seminal, cuando se compararon los pacientes con cultivo positivo para *Micoplasma*, con aquellos en los que el cultivo fue negativo. Los cambios seminales consistían en volúmenes más elevados y concentraciones de espermatozoides más bajas.

Estos autores también señalaron un incremento significativo de espermátides inmaduras y de espermatozoides de forma alargada, ovals y microcefálicos y que, con

excepción de éstos últimos, se habían considerado como un patrón de estrés en infecciones virales y reacciones alérgicas.

Se ha publicado que el *U. urealyticum* está presente en el 29% de los casos de uretritis, en el 15% de los casos de prostatitis y en el 3,5% de epididimitis aguda no gonocócica (Meseguer *et al.*, 1984). Pero mucho antes, en 1970, Kundsinn *et al.*, demostraron por primera vez la presencia de *U. urealyticum* en el tracto genital de una pareja infértil y el tratamiento con tetraciclina permitió la erradicación de la bacteria y favoreció el embarazo.

El papel etiológico de *U. urealyticum* en la infertilidad fue sugerido también por Gnärpe y Friberg, quienes en 1972, demostraron una alta frecuencia de cultivos positivos en el semen de pacientes infértiles (85%), comparado con un 22% de hombres fértiles. Estos mismos autores en 1973, investigando aspectos de infertilidad, demostraron, mediante microscopía electrónica de barrido, que los Micoplasmas se adherían al espermatozoide. Estas observaciones sobre la asociación física de *Mycoplasma sp.* con los espermatozoides fueron luego confirmadas por otros autores (Fowlkes *et al.*, 1975; Xu *et al.*, 1997; Núñez-Calonge *et al.*, 1998; Díaz-Gutiérrez y Gallegos, 1999).

Estudios citomorfológicos en cortes semifinos de centrifugado seminal obtenidos de pacientes infértiles, permitieron la descripción de la presencia de *Mycoplasma sp.* y *C. trachomatis*, dentro y adheridos a células inflamatorias, epiteliales, espermátogénicas inmaduras y en espermatozoides (Gallegos *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha vuelto a valorar el papel fundamental de las infecciones genitales por *Mycoplasma sp.* en la salud reproductiva, y su asociación con: aborto séptico, bajo peso de los niños al nacimiento, infecciones perinatales, fiebre puerperal, partos prematuros e infertilidad de etiología inexplicada (Núñez-Troconis, 1999; Svenstrup *et al.*, 2003; Gdoura, 2007).

Núñez-Calonge *et al.*, (1998), determinaron que concentraciones de 25 UCC (unidades cambiadoras de color) por cada espermatozoide causan una importante reducción de la motilidad espermática y una alteración de la permeabilidad de su membrana, demostrada mediante la prueba de *shock* hipoosmótico, realizada cuatro horas después de la incubación de los espermatozoides con las bacterias.

Por otra parte, bacterias de la especie *Mycoplasma* han sido aisladas en semen de hombres fértiles y aparentemente sanos (De Louvois y Beader, 1974). Cerca de la mitad de hombres sanos y sexualmente activos tienen *U. urealyticum* colonizando la uretra

(Shepard, 1970); generalmente, la cantidad de bacterias es pequeña, (10^3 - 10^4 UCC/ml), pero en algunos pacientes puede ser mayor (10^8 UCC/ml) y no es fácil distinguir una colonización de los casos con una infección asintomática (Meseguer *et al.*, 1984).

La presencia de *U. Urealyticum* se viene asociando a piospermia desde hace décadas. Rehewy *et al.*, en 1978, no encontraron diferencia estadística en la frecuencia de cultivos de semen positivos, cuando se compararon hombres fértiles con infértiles. Estudiando 138 muestras de semen de pacientes infértiles, se aisló *U. urealyticum* en el 29% de los pacientes infértiles y en el 36% de los voluntarios fértiles. El crecimiento bacteriano fue acentuado en el 32% de los eyaculados positivos de pacientes y en el 42% de los voluntarios fértiles. En ambos casos, el estudio ultraestructural pudo demostrar que el microorganismo estaba adherido o en el interior de los espermatozoides. Además, la presencia de *U. urealyticum* no alteró las características seminales ni la supervivencia de espermatozoides en el moco cervical.

Se han realizado estudios sobre el efecto de la co-incubación de espermatozoides humanos con *C. trachomatis* o *U. urealyticum in vitro*, registrándose una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles y un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hosseinzadeh *et al.*, 2001; Nuñez-Calonge *et al.*, 1998). Contrario a lo publicado previamente por Talkington *et al.*, (1991), quienes descartaron que la incubación de espermatozoides *in vitro* con altas concentraciones de bacterias de tres diferentes serotipos de *U. urealyticum* durante 45 minutos, tuviera efecto sobre la motilidad y la capacidad de su penetración en la zona pelúcida del ovocito.

Por último, debemos considerar que en los casos de enfermedades de transmisión sexual la coexistencia de dos o más agentes patógenos ocurre con frecuencia. Nuestro grupo publicó recientemente que infecciones del tracto genitourinario de varones infértiles ocasionadas por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* inducen la fragmentación del ADN de los espermatozoides, alteraciones citomorfológicas y reduce notablemente el potencial de fertilidad del varón infectado (Gallegos *et al.*, 2008).

1.5 Fragmentación en el ADN del espermatozoide

El daño en el ADN de los espermatozoides es considerado un factor importante en el deterioro de la fertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica en la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, donde no es posible realizar una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño genómico.

Se estima que el 50% de las causas de infertilidad masculina son de origen no conocido, un 50% los casos de infertilidad son atribuibles al factor masculino. Otras causas de infertilidad podrían estar relacionadas con daño en el ADN de los espermatozoides por lo que el análisis de las características del semen es esencial en la valoración de la pareja con dificultades reproductivas (Schmid *et al.*, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (2001), estableció parámetros seminológicos que se deben analizar de forma rutinaria en el estudio del factor masculino de la infertilidad conyugal, el volumen de eyaculado, la concentración de espermatozoides, su motilidad y su morfología; aun considerando estas recomendaciones se ha estimado que aproximadamente un 10 a 15% de los varones subfértiles presentan parámetros seminales dentro de los rangos de normalidad establecidos (Morales *et al.*, 2007). En estos casos el origen de la infertilidad masculina podría deberse, entre otras causas, a defectos en la membrana del espermatozoide, factores ambientales o factores genéticos que no se reflejen en alteraciones de los parámetros seminales convencionalmente incluidos en el seminograma (Sinawat, 2000; Nakamura, 2001; Rajeev y Reddy, 2004).

En los últimos años, el daño del ADN espermático, es considerado como causa probable de disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide y de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación de la fibra de ADN, e incluirlas en el estudio del factor masculino de la esterilidad conyugal (Fernández *et al.*, 2005b).

Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides humanos exhiben una alta tasa de daño en el ADN y que éste se acentúa en condiciones patológicas que conducen a infertilidad (Aitken *et al.*, 2004; Agarwal y Said, 2003; Saleh *et al.*, 2002; Tesarik, 2006; Fernández *et al.*, 2005a).

Dado que la transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y en el desarrollo embrionario.

En cualquier etapa del proceso de proliferación y maduración de las células germinales masculinas desde espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides, se puede producir un daño en el ADN espermático el cual puede ser de naturaleza multifactorial (Erenpreiss *et al.*, 2006).

Se conocen algunos factores que producen daño irreversible en el ADN del gameto masculino. El listado incluye: generación de radicales libres de oxígeno (Zini *et al.*, 2001; Aitken y Krausz, 2001); empaquetamiento anormal de la cromatina por errores en

la sustitución de histonas por protaminas (Manicardi *et al.*, 1995; Sakkas *et al.*, 1999), deficiencias en la recombinación (Agarwal y Allamaneni, 2004), apoptosis espermática debida al contacto directo con bacterias o sus productos (Satta *et al.*, 2006) y causas externas que pueden provocar o potenciar los efectos anteriores. Entre estos se encuentran determinadas condiciones ambientales (contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada) o patológicas, como la criptorquidia, el varicocele, y los procesos inflamatorios o infecciosos del tracto genital (Agarwal y Said, 2004).

Los radicales libres son especies químicas con un electrón no apareado y de comportamiento altamente reactivo, estos compuestos pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Los sustratos moleculares con los que reaccionan incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Membrillo *et al.*, 2003).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) más destacadas corresponden al anión superóxido (O_2^-) y al hidroxilo ($-OH$). La interacción de estos elementos con el material genético modifica el ADN, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula. (Agarwal *et al.*, 2005).

Los ROS producen daño a los fosfolípidos contenidos en la membrana y en el ADN de espermatozoides humanos y están implicados de manera negativa en la infertilidad masculina. La producción de ROS y el daño del ADN son mayores en espermatozoides inmaduros con retención citoplásmica y en espermatozoides con anomalías morfológicas de la cabeza (Ollero *et al.*, 2001). También se ha reportado que la peroxidación lipídica asociada a ROS provoca una disminución de la movilidad y viabilidad espermática, de la integridad del acrosoma y del potencial de membrana mitocondrial (Baumber *et al.*, 2000).

En espermatozoides humanos el H_2O_2 causa fragmentación del ADN reduciendo su motilidad y alterando la capacidad de fusión con el ovocito (Aitken *et al.*, 2001). Datos obtenidos por Larson-Cook *et al.*, en el 2003, mostraron que el índice de fragmentación del ADN no siempre estaba relacionado con parámetros seminales anormales. Sólo un 30% de los varones con un índice de fragmentación del ADN superior al 27% presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia.

La reacción inflamatoria, en el tracto genital masculino puede resultar en estrés oxidativo por sobreproducción de ROS. Estos pueden causar directamente el daño del

ADN del espermatozoide o inducir una respuesta de tipo apoptótica que resulte en fragmentación del ADN (Aitken *et al.*, 2001).

Estudios de co-incubación *in vitro* señalaron un papel directo de *C. trachomatis* en la inducción de la fragmentación de ADN en espermatozoides, pero entonces se consideró que el origen de la fragmentación del ADN *in vivo* podría ser más complejo (Hosseinzadeh *et al.*, 2000).

Diversos estudios describen que bacterias de la especie *Mycoplasma* pueden provocar daño oxidativo así como alteraciones morfológicas en el espermatozoide, por lo que este patógeno puede ser uno de los causantes del daño en las células espermáticas en estos pacientes (Reichart *et al.*, 2001; Díaz-García *et al.*, 2003; Guerra-Infante *et al.*, 2005). De hecho, según el trabajo de Díaz-García. en el año 2003, los ROS pueden estar elevados en los pacientes con *U. urealyticum*, y la incubación *in vitro* con esta bacteria y el consecuente incremento en la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides pudiera ser secundaria a lipoperoxidación como consecuencia de la producción de ROS.

Gandini *et al.*, en el año 2000, estudiando la relación entre apoptosis y parámetros seminales, también demostraron que un incremento de la fragmentación de ADN estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática y motilidad espermática. Esta correlación se observó también con la morfología. Los espermatozoides que mostraban rupturas en su ADN presentaban cabezas pequeñas y amorfas.

Se considera que en espermatozoides considerados como normales existen niveles equilibrados de ROS, pero el desequilibrio en su producción y degradación causa efectos adversos, tales como el mal funcionamiento de las mitocondrias y la apoptosis celular (Ball *et al.*, 2002).

Diversos autores han encontrado una estrecha asociación entre parámetros seminales anormales y rupturas en el ADN nuclear de los espermatozoides del eyaculado en humanos. La fragmentación del material genético del espermatozoide es mayor en pacientes diagnosticados con oligoteratoastenozoospermia (Zini *et al.*, 2001) Huang *et al.*, (2005), estudiaron este fenómeno usando el ensayo TUNEL, apreciando que el índice de fragmentación del ADN era significativamente mayor en pacientes con parámetros seminales anormales.

Eley *et al.*, (2005 a) y Satta *et al.*, (2006), observaron que *C. trachomatis* aumenta la frecuencia de espermatozoides con translocación de la fosfatidilserina en la

membrana plasmática y los niveles de fragmentación del ADN, determinados con el marcaje con Anexina V y por la prueba de marcaje del extremo nucleotídico terminal de la uridina (Técnica de TUNEL), respectivamente.

A pesar de que en la mayoría de los casos la fragmentación se relaciona con alteraciones seminales, es muy importante destacar que el 8% de los varones con parámetros seminales normales (infertilidad de origen desconocida) también presentan fragmentación en su ADN (Morales *et al.*, 2007).

En estudios realizados por nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. José Luis Fernández, (La Coruña, España), se encontró que el daño en el ADN espermático de hombres infértiles, estaba asociado a la presencia de agentes infecciosos. Las bacterias identificadas en los 143 pacientes que se estudiaron fueron *C. trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma fermentans*. En éste estudio se consiguió también corroborar la influencia positiva en la terapia antibiótica respecto a la integridad del ADN y de los parámetros convencionales del análisis seminal (Gallegos-Ávila *et al.*, 2008).

Los leucocitos pueden producir ROS o pueden estimular su producción en el espermatozoide. Gallegos *et al.*, (2008), encontraron que la concentración de ROS en los pacientes infectados por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* fué 5,2 veces mayor que en los controles sanos, aunque las cifras estuvieron por debajo del umbral de leucocitospermia establecido por la OMS. Sin embargo, su influencia en la producción de niveles anormales de ROS podría ser importante, sobre todo cuando han estado presentes crónicamente. De hecho, Henkel sugirió en el año 2005, que la cifra de referencia de $1 \times 10^6/\text{mL}$, debe ser re-evaluada porque recuentos más bajos de leucocitos pueden comprometer la integridad del ADN (Henkel *et al.*, 2005).

Por último, la infección simultánea por Micoplasma y Clamidia podría incidir en la mayor producción de daño del espermatozoide. Nosotros hemos reportado que niveles altos de rupturas en el ADN se asociaron a la presencia de estas bacterias que en combinación tuvieron un efecto sinérgico sobre el daño de la estructura del ADN (Álvarez-Cuevas *et al.*, 2008).

1.5.1 Técnicas empleadas para la evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide.

En la actualidad se cuenta con una diversidad de técnicas que permiten estudiar la fragmentación de la cromatina del espermatozoide. Algunas pruebas evalúan la

susceptibilidad del ADN espermático cuando se somete a diversos tratamientos y otras se basan en el marcaje de las rupturas en la cadena de ADN mediante la incorporación de fluorocromos.

En el primer grupo de pruebas encontramos a: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), DBD-FISH (DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization), Dispersión de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Dispersion), Ensayo Cometa, la prueba de Naranja de Acridina, la tinción de Azul de toluidina, y la tinción con Azul de anilina. El segundo grupo de pruebas está constituido por la técnica de TUNEL (Terminal *dUTP* Nick-End Labeling) y la prueba de ISNT (In Situ Nick Translation).

La prueba de SCSA desnaturaliza la molécula de ADN aplicando una solución ácida y tiñéndola posteriormente con naranja de acridina. Este fluorocromo se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una radiación con una longitud de onda de 530 nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN desnaturalizado) emite una radiación con longitud de onda de 640 nm (color rojo). Las células se separan por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado y por tanto se visualizaría en color rojo (Morales *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2009).

La técnica de SCD consiste en producir descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteización, de manera que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN (Fernández *et al.*, 2003; Schulte *et al.*, 2009).

El Ensayo Cometa se lleva a cabo incluyendo los espermatozoides en un microgel de agarosa situado sobre un portaobjetos, y sometidos a una lisis mediante un agente reductor de grupos sulfhidrilo de las protaminas. Los núcleos desproteizados se someten a electroforesis y se tiñen con sustancias fluorescentes. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico generando una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen (Singh *et al.*, 1988).

La técnica de TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con un fluorocromo en los extremos 3'-OH de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se lleva a cabo mediante una transferasa terminal (desoxinucleotidil transferasa). La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN (Lopes, *et al.*, 1998).

1.6 Tratamiento antioxidante

Un antioxidante con función biológica se define como una sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato resultando un agente reductor más potente (Hicks, 2001).

El plasma seminal es una fuente importante de antioxidantes, en el epidídimo los espermatozoides son protegidos de los ROS por acción de 5 enzimas preservadoras del proceso de maduración de las células, estas corresponden a la glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Estas tres últimas enzimas intracelulares inhiben el daño oxidativo (Tramer *et al.*, 1998; Zini *et al.*, 2009).

En el líquido seminal también se han encontrado algunos antioxidantes no enzimáticos como son el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), hipotaurina y taurina, albúmina, carnitina, carotenoides, flavonoides, uratos y prostasomas; en conjunto todos estos elementos, confieren protección a los espermatozoides contra el daño oxidativo (Holmes *et al.*, 1992; Tremellen, 2007).

Las mitocondrias de los espermatozoides contienen grandes cantidades de PHGPx, una de las principales enzimas que ayuda contra la peroxidación producida por el H_2O_2 y su disminución se asocia a infertilidad (Imai *et al.*, 2001).

El sistema de anti oxidación exógena que proveniente de la dieta alimenticia comprende a las vitaminas E y C, el β -caroteno, el retinol y los carotenoides, que son poderosos antioxidantes. Estas moléculas disminuyen el grado de lipoperoxidación lipídica cuando se encuentran en concentraciones óptimas.

La vitamina C o ácido ascórbico es el principal antioxidante en el plasma y dentro de la célula, al donar electrones al radical tocoperoxil de la vitamina E oxidada; de esta manera recicla la función antioxidante del α -tocoferol, ayudando a proteger la membrana lipídica de la peroxidación (Membrillo *et al.*, 2003).

El tratamiento para infecciones ocasionadas por Clamidia y Micoplasma ha sido por mucho tiempo dirigido al control de los signos y síntomas. Diversos autores han

reconocido las dificultades que presentan las infecciones por *Chlamidia* y *Mycoplasma* cuando se busca la erradicación del germen, mayormente si existen ya complicaciones o secuelas cicatriciales (Sheeder *et al.* 2006).

En el caso de la infección por *Chlamidia* resulta difícil establecer el tiempo que debe perdurar el tratamiento, y el efecto de la terapia antibiótica no se refleja en cambios seminales evaluados a través de parámetros convencionales (Whittington *et al.*, 2001; Golden *et al.*, 2000).

Por otra parte, algunos autores han asociado la exposición del espermatozoide a las especies reactivas de oxígeno (ROS) con alteraciones en los parámetros seminales, defectos en la morfología y afectación en la tasa de fertilidad cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida (Aitken y Fisher, 1994; Greco *et al.* 2005).

Para contrarrestar los efectos de ROS y el daño oxidativo sobre el ADN, el espermatozoide cuenta con mecanismos limitados de defensa natural: condensación del ADN por protaminas y glutathione peroxidase mitocondrial, pero estos han resultado ser insuficientes en las infecciones genitourinarias (Lewis *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 2001).

La vitamina C ayuda a proteger la membrana lipídica de la peroxidación (May, 1999). Se ha establecido, una relación positiva entre el uso de ácido ascórbico y la mejoría de parámetros del seminograma (Dawson *et al.*, 1992; Lewis, 1997).

Se ha encontrado que los hombres subfértiles presentan un mayor número de células espermáticas con daño en el ADN, por lo que resulta importante implementar estrategias que identifiquen de manera temprana y además reduzcan el daño en las células espermáticas. Estas estrategias pudieran incluir la eliminación de las endotoxinas testiculares, el tratamiento contra las infecciones de la vía genitourinaria, tratamiento quirúrgico contra el varicocele y el uso de antioxidantes, que en conjunto todas ellas lleven a mejorar el estado de salud del varón subfértil.

Por último la determinación del efecto del tratamiento antibiótico suplementado con antioxidantes sobre los niveles de daño en el ADN, puede representar una guía para la toma de decisiones durante el manejo del paciente infértil y con infección genitourinaria.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Las publicaciones recientes enfocadas a la explicación de los factores que producen daño en el ADN del espermatozoide, no contemplan a las coinfecciones genitourinarias ocasionadas por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, como causa importante en el deterioro del contenido genético de los espermatozoides.

En el conocimiento publicado hasta el momento, la influencia de la infección genitourinaria por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, en los parámetros seminales convencionales y el potencial de fertilidad del espermatozoide, no es clara y los limitados estudios son controversiales.

Hasta el momento de inicio de este trabajo de tesis, no hemos encontrado investigaciones sistemáticas en series de pacientes con infección genitourinaria por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* que analicen estos aspectos, por lo que consideramos que era necesario realizar estudios que aportaran conocimiento y evidencia para confirmar la posible relación entre las alteraciones en el líquido seminal y la fragmentación del ADN espermático.

Además, el efecto de la combinación de antibióticos, anti-inflamatorios y antioxidantes pudiera generar evidencias sobre el impacto de las infecciones genitourinarias por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* determinando su influencia en la reversión del daño en el ADN espermático, el incremento de la calidad seminal y la recuperación de la fertilidad.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Principal.

Determinar los niveles de fragmentación del ADN espermático antes y después del tratamiento antibiótico y antioxidante contra infecciones genitourinarias ocasionadas por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* en hombres subfértiles.

Secundarios.

Primero:

Correlacionar los niveles de fragmentación del ADN con otras alteraciones espermáticas y seminales presentes en hombres infértiles con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* antes y después del tratamiento antibiótico y antioxidante.

Segundo:

Analizar la evolución de trastorno reproductivo de los pacientes después del tratamiento antibiótico y antioxidante contra *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* y su correlación con los parámetros seminales y espermáticos evaluados.

Tercero:

Determinar si existen entre los parámetros seminales y espermáticos analizados algunos con valor predictivo para la recuperación de la fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio especializado de andrología SERTOLI Asociados AC. en Monterrey, Nuevo León, México y en el Laboratorio de Andrología del Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en la Ciudad de Monterrey, México.

El estudio no fue sometido a aprobación por un consejo de ética institucional debido a que los pacientes proceden de una clínica de fertilidad privada en la que no opera un consejo como tal, pero todos los pacientes firmaron de manera voluntaria un documento en el que se les daba información del trabajo y se especificaba que la muestra seminal sería analizada.

4.1 Casos incluidos en el estudio

4.1.1 Grupo de pacientes

El grupo de estudio está conformado de hombres subfértiles, infectados por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* Estos pacientes se seleccionaron a partir de los pacientes que acudieron a la consulta de Andrología del Laboratorio especializado SERTOLI AC (Monterrey, Nuevo León, México), de acuerdo a los siguientes criterios:

4.1.1.1 Criterios de inclusión

- Hombres con falla reproductiva o incapacidad para procrear.
- Mayores de edad.
- Con diagnóstico microbiológico de *C. trachomatis*, *Mycoplasma sp.* o ambos, presentes en el líquido seminal.
- Pacientes sin tratamiento antibiótico y antioxidante reciente o actual.
- Pacientes que aceptaran participar en el estudio y que firmaran el consentimiento informado.
- Pacientes sin antecedente de alergia al tratamiento.

4.1.1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que no cumplieran con los criterios de inclusión.
- Hombres fértiles o de paternidad reciente.

- Pacientes con diagnóstico microbiológico negativo para *C. trachomatis*, *Mycoplasma sp.* o ambos en líquido seminal.
- Pacientes azoospermicos, en el líquido seminal.
- Pacientes que se negaran a participar en el estudio.
- Pacientes que no firmaran el consentimiento informado.

4.1.2 Grupo de control

Para este proyecto se incluyeron un grupo de voluntarios sanos seleccionados en base a los siguientes criterios:

4.1.2.1 Criterios de inclusión:

- Hombres mayores de 18 años.
- Que aceptaran entrar al estudio de manera voluntaria, sin retribución económica y que firmaran el consentimiento informado.
- Con fertilidad comprobada y de paternidad reciente.
- Que presentaron seminograma con parámetros de normozoospermia.
- Con pruebas microbiológicas negativas para *Mycoplasma sp.* y *Chlamydia trachomatis*, en el líquido seminal.
- Que no estuvieran bajo tratamiento antibiótico y antioxidante al momento de la evaluación.

4.1.2.2 Criterios de exclusión

- Voluntarios que no cumplieran con los criterios de inclusión.
- Que estuvieran bajo tratamiento antibiótico y antioxidante reciente o actual.
- Que no aceptaran participar en el estudio.
- Que no firmaran el consentimiento informado.

4.2 Número de pacientes, base de datos y confidencialidad.

Para la realización de este trabajo de tesis se planteó un estudio prospectivo mediante selección aleatoria de los casos partiendo de la información recogida en la historia clínica de cada uno de los casos estudiados, creando una base de datos que nos permitiera realizar el análisis de los datos con el objetivo de estudiar posibles asociaciones entre las características clínicas y los hallazgos de laboratorio. La

identificación de cada uno de los pacientes y de los controles fue a través de la asignación de una clave de confidencialidad, la cual se ha mantenido en anonimato en todo momento. Los datos de nombres y claves están restringidos y solo tuvieron acceso a esta información el médico especialista y el responsable del proyecto.

Se incluyeron 70 pacientes elegidos al azar y que cumplían todos los criterios de inclusión, a partir de los casos atendidos en la consulta de Andrología, en un periodo comprendido del 2004 al 2011, para diagnóstico y tratamiento de infección genitourinaria y de los cuales se tenían los datos clínicos y de laboratorio. Se contó además con la participación de 28 voluntarios sanos que cumplieron los criterios de inclusión ya descritos.

4.3 Muestras biológicas

A cada uno de los hombres incluidos en este estudio se le solicitó una muestra seminal previa al tratamiento antibiótico y antioxidante, durante el tratamiento y al finalizar el tratamiento.

Para la obtención de la muestra seminal se siguieron las recomendaciones publicadas por la European Society of Human Reproduction and Embryology, la Organización Mundial de la Salud (1999) y el manual de procedimientos del Laboratorio Seminológico Especializado SERTOLI AC.

La muestra seminal fue obtenida bajo los siguientes criterios y recomendaciones:

- a) Obtención de la muestra seminal se efectuó en un ambiente privado dentro de las instalaciones de la clínica de fertilidad SERTOLI.
- b) Los pacientes con infecciones agudas, episodios febriles o intervenciones quirúrgicas recientes reprogramaron la obtención de la muestra seminal bajo la indicación del clínico consultante.
- c) Para la obtención de la muestra se recomendó abstinencia sexual de 3 a 7 días.
- d) La muestra seminal fue obtenida por masturbación sin el uso de lubricantes en un contenedor estéril de polipropileno neutro y boca ancha, previo aseo genital y lavado de manos.
- e) Muestras seminales con pérdida de volumen durante la obtención no fueron aceptadas para el estudio.

Una vez obtenida, la muestra se transportó al laboratorio en un tiempo no mayor a los 5 minutos donde se llevó a cabo los estudios correspondientes. La muestra fue

mantenida a una temperatura controlada de entre 25 y 30°C durante la ejecución de las pruebas de laboratorio.

Después de la licuefacción de la muestra se separaron alícuotas de líquido seminal con volúmenes diferentes para la realización de las pruebas en base a lo siguiente:

1. Identificación microbiológica de los *Micoplasmas* (100µl).
2. Búsqueda de *Chlamydia trachomatis* (100µl).
3. Fragmentación de la Cromatina del espermatozoide (50µl).
4. Análisis de la morfología espermática (30µl)
5. Crio preservación del líquido seminal a -20°C (100µl).

El resto de la muestra seminal fue reservado y conservado a temperatura del laboratorio para la realización del seminograma y una vez concluidas las pruebas el remanente seminal fue almacenado a temperatura de -20°C.

4.4 Terapia antibiótica y antioxidante

Considerando que la sensibilidad antibiótica del género *Chlamydia* es habitualmente similar al del género *Mycoplasma*, la terapia antibiótica se eligió tomando en cuenta el antibiograma del cultivo de Micoplasma, así como la tolerancia del paciente.

Se incluyó siempre alguna combinación de un macrólido, una tetraciclina o una quinolona, durante un período variable en función de la evolución de los síntomas y del seguimiento de laboratorio. También se incluyeron cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico asignado.

Las dosis administradas a los pacientes fueron:

- Macrólidos: Los de elección para Clamidias y Micoplasmas fueron la Azitromicina que se administró a dosis de 500 mg dos veces al día o la Claritromicina dosificada a razón de 500 mg dos veces al día para un adulto de peso promedio de 70 kg.
- Tetraciclinas: La que se indicó más frecuentemente fue la Doxyciclina administrada a dosis de 100 mg tres o cuatro veces al día y en menor número de pacientes se utilizó la Tetraciclina a dosis de 500 mg dos o tres veces al día dependiendo de la tolerancia del paciente y de la severidad del cuadro infeccioso.

- Quinolonas: Se eligió alguna de las quinolonas de tercera y cuarta generación, ya fuera la Ofloxacin (400 mg dos veces al día), Ciprofloxacina (500 mg dos veces al día), o la Levofloxacina (500 mg dos veces al día o 750 mg en dosis única).

En todos los pacientes el tratamiento antibiótico se complementó con vitamina E (alfa-tocoferol, 1600 a 2000 unidades diarias en dosis única o fraccionada), Ácido Fólico (20 µg/día en dosis única o fraccionada), Coenzima Q10, (100mg/día) y 2 gramos al día de Vitamina C (Ácido Ascórbico). Este tratamiento se extendió por lo menos dos semanas después del término del tratamiento antibiótico.

Como recomendaciones generales a los pacientes se les indicó: Ingesta de líquidos no menor a 2 litros diarios, eyaculaciones frecuentes (cada 24 a 48 horas) y uso de preservativo en la relación sexual. Así mismo, se realizó simultáneamente diagnóstico microbiológico y tratamiento de infección genital y evaluación ginecológica en las cónyuges de los pacientes infértiles.

4.5 Técnicas de laboratorio

4.5.1 Análisis del líquido seminal

Las muestras de líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio fueron agrupadas y analizadas en base al siguiente orden:

1. Muestra seminal basal (Basal). Corresponde a la primer muestra de líquido seminal solicitada al paciente, previa a la administración del tratamiento antibiótico y antioxidante.
2. Muestra seminal dos (Primer ciclo). Muestra seminal obtenida una semana después de haber terminado el primer ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante.
3. Muestra seminal tres (Segundo ciclo). Muestra seminal obtenida después de terminado el segundo ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante.
4. Muestra seminal cuatro (Tercer ciclo). Muestra seminal obtenida después de terminado el tercer ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante.

Para la comparación de los parámetros seminales y espermáticos propuestos, analizamos 28 muestras seminales de voluntarios sanos estudiados clínicamente y seleccionados bajo los criterios de inclusión y exclusión descritos en el apartado de materiales. Cada voluntario aportó para su análisis 2 muestras seminales obtenidas en

no más de 7 días una de la otra; éstas muestras fueron procesadas bajo las mismas condiciones de análisis descritas para el grupo de pacientes.

A las muestras seminales obtenidas les realizamos un análisis completo de los parámetros seminales sugeridos por la *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction*, 1999; *ESHRE*, 2002 y las consideradas en base a la experiencia del personal profesional del Laboratorio *SERTOLI AC* y del *Laboratorio de Andrología* de la UANL. Los parámetros incluyeron:

1. Análisis macroscópico o físico-químico (volumen, color, viscosidad y pH).
2. Análisis microscópico en fresco. Descripción de los hallazgos citológicos como la presencia de restos celulares en el eyaculado, presencia de células redondas y la presencia de células epiteliales.
3. Recuento de espermatozoides.
4. Valoración de la motilidad espermática. Se consideraron 5 parámetros de clasificación en la evaluación del movimiento del espermatozoide que incluyen: Espermatozoides sin movimiento, espermatozoides con movimiento *in situ*, espermatozoides con movimiento curvilíneo, espermatozoides con movimiento rectilíneo y motilidad progresiva total.
5. Vitalidad de los espermatozoides. Su análisis se realizó después de una hora de haber sido obtenidos y se utilizó un colorante supra-vital (eosina amarilla al 1% en buffer de fosfatos pH 7.8 Merk C.I. 45380).
6. Cuantificación de células inflamatorias. Leucocitos evaluados por la técnica de peroxidasa y células fagocíticas identificadas con la tinción de rojo neutro (Merk C.I. 50040).
7. Análisis de la morfología espermática. Este parámetro se realizó en un frotis del semen, el cual después de haber sido fijado con alcohol etílico (5 minutos), se contrastó con Hematoxilina de Harris al 30% en H₂O Destilada (5 minutos) y con Verde Brillante al 0.1 % en metanol por 30 segundos. Los espermatozoides fueron analizados en un microscopio de campo claro ZEISS AXIOSTAR y se contaron 200 espermatozoides clasificándolos en base a normalidad celular reportando los resultados en valores percentiles. Los espermatozoides anormales fueron cuantificados y clasificados en base a las siguientes alteraciones:
 - a) Defectos de la cabeza (macrocéfalo, microcéfalo, bicéfalo, piriforme y cabeza de alfiler).

- b) Defectos del núcleo (disminuido, elongado, binucleado, multinucleado, segmentado, descondensado y vacuolado)
- c) Defectos del acrosoma (>70%, 20-39%, <20%, sin acrosoma amorfo, sin acrosoma redonda y acrosoma vacuolado).
- d) Defectos de la pieza media (engrosada, doblada y citoplasma residual).
- e) Defectos de la pieza principal del flagelo (enrollado, corto, grueso y doble)
- f) Defectos relacionados con lesión del núcleo (vacuolas intranucleares, núcleos descondensados, núcleos disminuidos y espermatozoides piriformes).

4.5.2 Prueba de inmunofluorescencia directa con anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis*.

En los 70 pacientes infértiles y en los 28 individuos del grupo control realizamos, mediante inmunofluorescencia directa, la detección de *C. trachomatis*, usando un anticuerpo monoclonal *anti-C.trachomatis* (Chlamydia Direct IF (ID), BIOMERIEUX SA). Los anticuerpos reconocen 15 serotipos de la especie *C. trachomatis* y permite detectar la bacteria en sus diferentes estadios de evolución: cuerpos elementales y cuerpos reticulares.

Las muestras de líquido seminal fueron concentradas mediante centrifugación a 4500 RPM por 20 minutos. Las muestras obtenidas las colocamos directamente sobre un portaobjetos, evaporando los líquidos contenidos en la muestra y posteriormente se fijaron con 500 µL de metanol y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que se evaporó el excedente.

Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal fluorescente anti-*Chlamydia* durante 30 minutos a temperatura controlada de 25°C. Después se retiró el exceso de reactivo con agua destilada y se colocó el cubreobjetos sellándose con una gota de glicerol. Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Axiostar, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), empleando objetivo de 63X y ocular de 10X con cifra de campo 18. Para cada observación se verificó la calidad del reactivo procesando un portaobjetos de control negativo y uno de control positivo (Chlamydia Direct IF(C+/C-), BioMerieux, Francia). De acuerdo a los fabricantes del Kit diagnóstico, se consideró positivo el resultado de esta prueba cuando se observaron más de 10 cuerpos elementales fluorescentes en el total de la muestra biológica analizada.

4.5.3 Cultivo para identificación de *Mycoplasma sp.*

Para la identificación de micoplasmas y ureaplasmas utilizamos un sistema de identificación bioquímica API, Mycoplasma IST 2 (BioMerieux, Francia), que contiene los sustratos específicos para el cultivo e identificación de varias especies de: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis*. Además, mediante este sistema se pudo realizar una cuantificación de la concentración de gérmenes, así como la comprobación de su susceptibilidad a los antibióticos.

Las muestras de líquido seminal se colocaron en 3 mL de medio de transporte que contenía peptona en solución de cloruro de sodio 0,65%, para inhibir el crecimiento de gérmenes Gram positivos y Gram negativos. La muestra diluida en el medio de transporte se mezcló con el medio de cultivo liofilizado que contiene los extractos lábiles del medio de cultivo: extracto de levadura, suero de caballo, urea, arginina, rojo fenol como indicador de pH, antibióticos y un antifúngico (para inhibir el crecimiento de flora bacteriana y micótica contaminante de la muestra). Una vez resuspendida la muestra de los pacientes con el liofilizado, se colocó una alícuota de 55 µl en cada uno de los 16 pocillos de la placa de multipocillos estériles; de este modo se puede realizar el aislamiento, la identificación y la prueba de susceptibilidad de los gérmenes frente a los antibióticos.

La distribución de las muestras en los distintos pocillos fue la siguiente:

| | |
|--|---|
| Pocillo 1: Control de muestra | Pocillos 8 y 9: Josamicina (2 y 8 mg/L) |
| Pocillo 2: Identificación de <i>U. urealyticum</i> | Pocillos 10 y 11: Ofloxacina (1 y 4 mg/L) |
| Pocillo 3: Identificación de <i>M. hominis</i> | Pocillos 12 y 13: Eritromicina (1 y 4 mg/L) |
| Pocillo 4: Título de <i>U. urealyticum</i> $>0=10^4$ UCC | Pocillos 14 y 15: Tetraciclina (4 y 8 mg/L) |
| Pocillo 5: Título de <i>M. hominis</i> $>0=10^4$ UCC | Pocillo 16: Pristinamicina (2 y 8 mg/L) |
| Pocillos 6 y 7: Doxiciclina (4 y 8 mg/L) | |

Una vez depositada la muestra en los pocillos, se cubrió cada uno con 2 gotas de aceite mineral estéril para crear un ambiente de anaerobiosis y evitar la evaporación del medio. La incubación se llevó a cabo a 37° C durante 72 horas para *U. urealyticum* y 5 días para *M. hominis* y *M. fermentans*. Al término del período de incubación, la prueba se consideró positiva para *U. urealyticum* cuando en el pocillo correspondiente el indicador, que originalmente es incoloro, viró a color naranja; en el cultivo positivo para *M. hominis*, el indicador viró a rojo cereza, y, por último, cambió a amarillo intenso en el caso de presencia de *M. fermentans*. El medio de transporte remanente, formado por

peptona en solución salina, debió permanecer transparente; contrariamente, la presencia de turbidez fue indicadora de contaminación.

4.5.4 Examen citológico en fresco para la detección de *Chlamydia* y *Mycoplasma*

El análisis citológico en fresco o citología en fresco de alta resolución ha sido utilizado como un método de diagnóstico para la búsqueda de bacterias compatibles con la especie *Chlamydia* y *Mycoplasma* y para la descripción de los parámetros citológicos asociados a la presencia de bacterias y a la inflamación. Este método propuesto por Ramos y Gallegos (2001), se basa en la aplicación de colorantes supra vitales para la descripción de los parámetros citológicos y se ha comparado con pruebas Gold standard encontrando una sensibilidad de 99,21% y una especificidad de 75,58 para el diagnóstico de *Chlamydia sp.* En el caso de *Mycoplasma* este método refiere una sensibilidad de 95,5% y una especificidad de 70,85% (actualmente se encuentra en patente).

Se preparó una solución de Eosina amarilla y de Rojo Neutro al 1% en solución salina estéril. Las muestras de líquido seminal fueron analizadas directamente con esta técnica y no fue necesaria la preparación de la muestra. En el caso de las muestras de exudado cérvico vaginal se resuspendieron en 500µL de solución salina estéril.

Se mezclaron volúmenes iguales del colorante con la muestra biológica y se analizaron de forma independiente en cada colorante utilizado.

Los Resultados de la reacción describen a los cuerpos elementales de *Chlamydia sp.* marcadamente basófilos de forma esférica y contorno regular, refringentes con halo periplasmático y tamaño aproximado de 1-2µL, así como a los cuerpos reticulares intracelulares de localización perinuclear color marrón y color rojo claro.

4.5.5 Evaluación de la fragmentación del ADN

En este estudio se utilizó la versión modificada de la prueba de SCD (Halosperm kit, INDAS Biotech, de Madrid, España). Una alícuota de cada muestra de semen se diluyó a una concentración de espermatozoides de 10 millones/mL. en buffer fosfato salino neutro. Un tubo Eppendorf con gel de agarosa con bajo punto de fusión se colocó en un baño de agua a 90-100° C durante 5 minutos para fundir la agarosa y después en un baño de agua a 37° C por 5 minutos, para permitir la estabilización a 37°C. Una alícuota de 60 µL de la muestra de semen diluida se añadió al tubo Eppendorf con el gel de agarosa fluidificada.

Alícuotas de 20 μ L de la mezcla semen-agarosa se depositaron sobre un portaobjetos previamente cubierto con el gel de agarosa colocando sobre ella un cubreobjetos de 22x22 mm. El portaobjetos se colocó sobre una platina fría en el refrigerador a 4° C por 5 minutos para permitir que la agarosa produzca un microgel con los espermatozoides atrapados en él.

El cubreobjetos fue retirado suavemente, y el portaobjetos se sumergió inmediatamente en posición horizontal en una solución ácida, previamente preparada mediante la mezcla de 80 μ L de HCl con 10 mL de agua destilada, y se incubaron durante 7 minutos a temperatura ambiente (22° C).

El portaobjetos fue sumergido horizontalmente en 10 mL de la solución de lisis durante 25 minutos. Después de lavar por 5 minutos en una bandeja con abundante agua destilada, cada portaobjetos fue deshidratado en baños de etanol a concentración ascendente (70, 90 y 100%) durante 2 minutos en cada uno, y se secaron al aire.

Para la tinción, el portaobjetos fue colocado en posición horizontal cubriéndolo con una mezcla a volúmenes iguales de solución de tinción de Wright (Merck, Darmstadt, Alemania) y PBS pH 6,8 (Merck) durante 5-10 minutos, con agitación continua y suave, luego se lavó rápidamente con agua corriente, y se dejó secar. Analizamos los nucleoides con un microscopio de campo claro y fluorescencia (Axio Scope, Carl Zeiss, Alemania) con objetivo de inmersión en aceite a 100X.

La categorización de los diferentes tamaños de halo se realizó utilizando el diámetro menor del núcleo central del propio nucleoide, como punto de referencia, con la cual se comparará la anchura del halo.

Cinco categorías de dispersión cromatínica se establecieron como pautas:

1. Espermatozoides con halos grandes cuya anchura es similar o mayor que el diámetro del núcleo central de menor tamaño.
2. Espermatozoides con halos medianos, cuyo tamaño está entre los de halo grande y halo muy pequeño.
3. Espermatozoides con halos muy pequeños cuya anchura es igual o menor de 1/3 del núcleo de menor diámetro.
4. Espermatozoides sin halo.
5. Espermatozoides con halo degradado, que es similar a los espermatozoides sin halo, pero ligeramente irregular o irregularmente teñidas.

Los espermatozoides con halo muy pequeño, sin halo, y sin halo y degradados contienen ADN fragmentado. Por cada muestra se contaron quinientos espermatozoides.

4.6 Análisis estadístico

Como hemos indicado anteriormente, se creó una base de datos informatizada utilizando el programa Excel (Microsoft Office, Versión 2007). Los datos fueron recogidos de la historia clínica y hojas de recogida de datos de laboratorio. Una vez limpiada la base de datos se realizó el análisis estadístico utilizando el programa estadístico SPSS 17 (SPSS Inc, Chicago).

4.6.1 Estadística descriptiva

Las variables cualitativas se resumieron mediante el cálculo de frecuencias absolutas de para cada modalidad y relativas expresadas en porcentajes. En el caso de variables cuantitativas, se procedió al cálculo de medidas de tendencia central media y/o mediana y de dispersión desviación estándar. Para ciertas variables se calculó el error estándar de la media. Las representaciones gráficas utilizadas estuvieron en función del tipo de variable diagrama de barras o sectores en el caso de variables cualitativas e histograma en el caso de variables cuantitativas.

4.6.2 Estadística inferencial

Con el objetivo de encontrar posibles diferencias entre los dos grupos estudiados se procedió a aplicar la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher (para tablas de contingencia de 2x2) para variables cualitativas.

Para analizar posibles diferencias entre ambos grupos y cuando la variable era de tipo cuantitativo, en un primer paso se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para estudiar el tipo de distribución que seguía la variable (normal o no normal). En los casos donde la variable presentaba una distribución normal se aplicaron las pruebas paramétricas (t de Student, ANOVA de un factor). En el caso de variables que no presentaron distribución normal se utilizaron los test no-paramétricos (U Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis).

4.6.3 Análisis de supervivencia.

Como en este trabajo se disponía de la fecha de inicio de tratamiento y de la fecha en la que se consiguió el embarazo, se definió una variable como “tiempo hasta embarazo” calculada como el tiempo que transcurre entre el inicio del tratamiento y la consecución del embarazo o la fecha en la que se realizó el último seguimiento del paciente antes del análisis estadístico. Para realizar las curvas de tiempo hasta embarazo se utilizó el método de Kaplan-Meier y la prueba de logrank para comparar las curvas.

Se ha intentado crear un modelo multivariante que nos indicara las variables clínicas y/o de laboratorio que pudieran ayudar a la predicción del embarazo con la finalidad de crear grupos con riesgos diferentes a “no embarazo”. Para ello se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox que nos permite calcular tanto los HR (Hazard ratio) como su intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Para todas las comparaciones realizadas se ha aplicado una prueba de dos colas dando como estadísticamente significativa aquellos valores de $p \leq 0,05$, con una potencia $(1-\beta) = 80\%$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Descripción clínica de los pacientes

Se han estudiado un total de 70 parejas, el cincuenta y cinco de ellas presentaban infertilidad primaria, definida como la incapacidad para la procreación al cabo de un año de relaciones sexuales no protegidas; el resto intentaban embarazo sin lograrlo aún cuando ya tenían descendencia (infertilidad secundaria). A la fecha de la última revisión de datos las parejas incluidas presentaban un promedio de 4,32 (1-7) años de infertilidad.

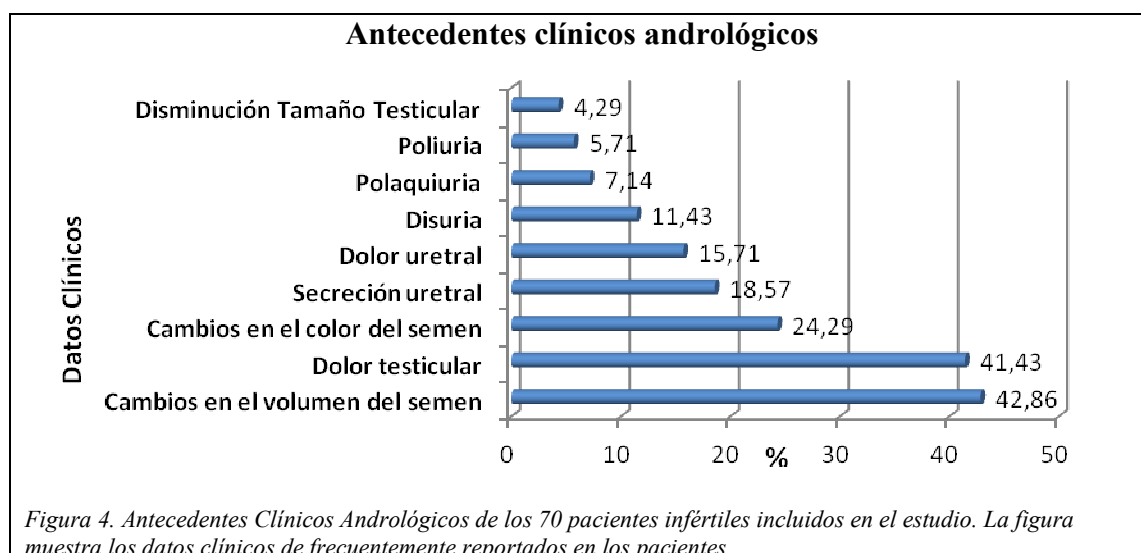
Para este estudio además de los datos procedentes de la historia clínica andrológica, se obtuvo información clínica ginecológica en 64 de las parejas de los pacientes incluidos.

5.1.1 Información andrológica

Los pacientes que estudiamos, tenían una media de edad de 34,37 (24-51) años, y de acuerdo a la información clínica recabada, la mayoría, 53 casos (75,71 %) carecía de signos o síntomas asociados a infección genitourinaria ya fuera en el momento de elaborar la historia clínica o como antecedente.

De los casos incluidos, 17 (24,29%) refirieron presentar en el momento de éste estudio un cuadro de uretritis, caracterizado por disuria (11,43%), poliuria (5,71%) y/o polaquiuria (7,14%); en el 24,29% de los casos hubo cambios en el color del líquido seminal; el 18,57% de los pacientes afirmaron haber presentado secreción uretral cristalina, y un número menor de pacientes reportó disminución en el tamaño testicular (4,29%) y cambios en el volumen del eyaculado (2,86%). Solo un paciente presentó crecimiento ganglionar inguinal asociado a infección genitourinaria mientras que ningún paciente refirió haber observado semen con características hemorrágicas. (Figura 4).

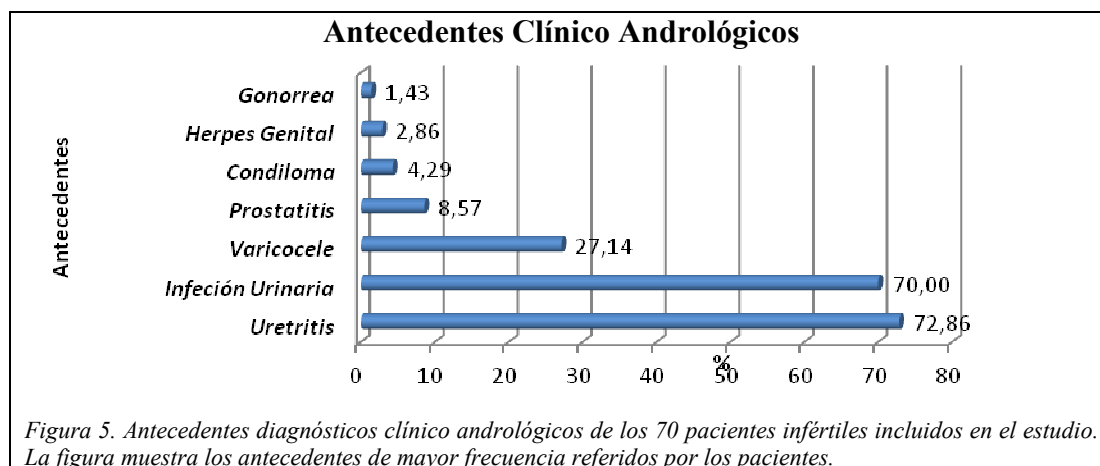
Cuando se indagó acerca del dolor en la vía genitourinaria, el 41,43% mencionó haber presentado episodios esporádicos y fugaces de dolor testicular y el 15,71% refirió dolor uretral asociado o no a la micción de manera. En menor número refirieron haber presentado algún episodio de dolor supra púbico y perineal (2,86%), un solo caso refirió dolor rectal (1,43%) y por igual, solamente un paciente dijo haber tenido un cuadro de litiasis urinaria. Siete pacientes mencionaron haber tenido alguna lesión peneana (10%), dos casos refirieron traumatismo genital (2,86%) y 3 refirieron lesiones testiculares (4,29%). (Figura 4)



Respecto a las infecciones de transmisión sexual 3 casos confirmaron haber tenido una lesión condilomatosa (4,29%), a dos casos se les había diagnosticado herpes genital (2,86%) y un solo caso refirió haber tenido gonorrea (1,43%). No se presentaron casos con antecedente de sífilis ni casos de HIV diagnosticado, en los pacientes encuestados.

Se recabó información clínica de los pacientes referentes a problemas de salud relacionados con la infertilidad, encontrándose un 27,14% de pacientes con varicocele que había sido diagnosticado con ecografía Doppler del contenido escrotal. La mayoría de ellos presentaban varicocele unilateral (78,95%) y el resto presentaron la forma bilateral (21,05%).

El 8,57% de los pacientes tuvieron antecedentes de diagnóstico de prostatitis y un número menor de pacientes tuvieron antecedentes clínicos de hernia inguinal (4,29%), hidrocele (2,86%) y orquitis (1,43%). En ninguno de los pacientes existió un diagnóstico previo de hiperplasia o cáncer prostático. (Figura 5)



5.1.2 Información ginecológica

La edad media de las 64 mujeres que se estudiaron en paralelo con los pacientes evaluados en éste estudio fue de 32,32 (24-42) años. Veintisiete de ellas refirieron el antecedente de pérdida gestacional temprana, es decir en las primeras 8 semanas de desarrollo embrionario; el número de abortos referidos varió entre 1 y 5 sumando 53 abortos entre todos los casos. En 14 de estas pacientes fue posible hacer el diagnóstico de embarazo anembriónico al detectar por ecosonografía pélvica la presencia de un saco gestacional vacío, mientras que en 21 mujeres (77,78%) el diagnóstico fue de suspensión del desarrollo embrionario y falta de latido cardíaco (huevo muerto retenido), por lo que fue indicada la suspensión del embarazo ya fuera con tratamiento médico o mediante legrado uterino por aspiración. La distribución de los abortos se muestra en la Tabla I.

| Pacientes con antecedente de pérdida gestacional temprana. 27 Pacientes (38,57%; Me=2 de 1-5; Total=53 abortos) | | | |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Embarazo Anembriónico (EAE) n=14 | | Huevo Muerto Retenido (HMR) n=21 | |
| Número de EAE/Paciente | Pacientes que presentaron el evento | Número de HMR/Paciente | Pacientes que presentaron el evento |
| 1 | 6 | 1 | 15 |
| 2 | 6 | 2 | 5 |
| 3 | 1 | 3 | 1 |
| 4 | 1 | | |
| Total de EAE en 14 pacientes: 25 | | Total de HMR en 21 pacientes: 28 | |

Tabla I. Antecedente de pérdida gestacional temprana en las cónyuges de los hombres infértiles incluidos en el estudio.

Otras complicaciones presentadas durante el embarazo en las pacientes con infertilidad secundaria fueron: amenaza de aborto (8,57%), infección gestacional (5,71%), embarazo ectópico (1,43%) y muerte fetal *in útero* (1,43%).

Más de la mitad de las mujeres se habían practicado tratamientos de reproducción asistida. El 56,25% (36) de ellas, refirieron haber sido inseminadas artificialmente entre 1 y 10 ocasiones. En total se realizaron 128 inseminaciones intrauterinas (IIU) en las 36 pacientes. La fertilización *in vitro* (FIV) como método de reproducción asistida, había sido practicada en 6 pacientes, acumulando 8 procedimientos. En 7 pacientes se realizó la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), entre 1 y 4 ocasiones para sumar 12 procedimientos de ICSI en el grupo de pacientes. (Tabla II)

| Antecedentes de tratamientos previos de reproducción Asistida | | | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| 36 Pacientes (56,25%) | | | | | |
| Inseminación Intrauterina (IUI) | | Fertilización <i>in-vitro</i> (IVF) | | Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) | |
| Número de IUI/Paciente | Pacientes que presentaron el evento | Número de IVF/Paciente | Pacientes que presentaron el evento | Número de ICSI/Paciente | Pacientes que presentaron el evento |
| 1 | 6 | 1 | 4 | 1 | 4 |
| 2 | 8 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 7 | | | 4 | 1 |
| 4 | 5 | | | | |
| 5 | 4 | | | | |
| 6 | 3 | | | | |
| 7 | 1 | | | | |
| 10 | 2 | | | | |
| Total de IUI en 36 pacientes: 128 | | Total de IVF en 36 pacientes: 4 | | Total de IUI en 36 pacientes: 12 | |
| Tabla II. Antecedentes de tratamientos previos de reproducción asistida practicados en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio | | | | | |

En la historia clínica ginecológica se investigaron y recogieron datos que nos informaran sobre padecimientos relacionados con infertilidad e infecciones genitourinarias, tales como cervicitis, endometritis, secuelas cicatriciales y falla ovárica, calificándose estos como leve, moderado y severo, dependiendo de la gravedad de las lesiones. Los hallazgos de la exploración física que se consignaron en la historia clínica por considerarlos relevantes fueron: cervicitis mucopurulenta, lesiones de la superficie externa del cuello uterino y estenosis del conducto cervical.

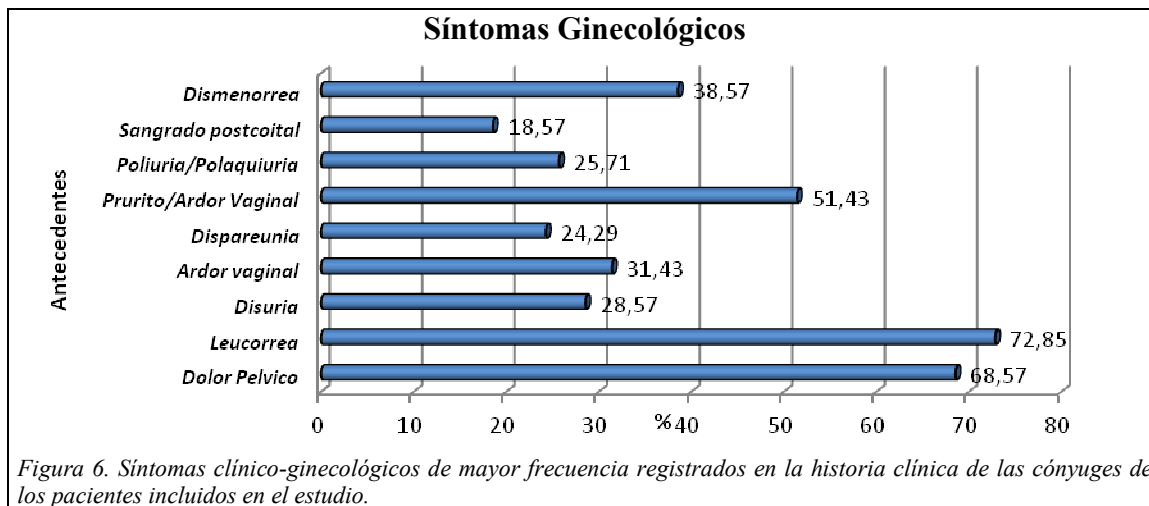
El diagnóstico ginecológico más frecuente fue de endometritis, basado en la presencia de sangrado menstrual atípico y oligomenorrea que se presentó en 63 pacientes (98.44%), calificándose en la mitad de ellas como de grado severo.

También con alta frecuencia se presentaron signos de lesión cervical en 54 mujeres (84,38%): 21 casos (32,8%) comprendían un cuadro severo de cervicitis mucopurulenta hipertrófica y erosiva, mientras que en 14 casos (21,9%) se informó de la existencia de lesión moderada del cérvix uterino y 19 pacientes (29,69%) presentaron un cuadro leve de lesión cervical.

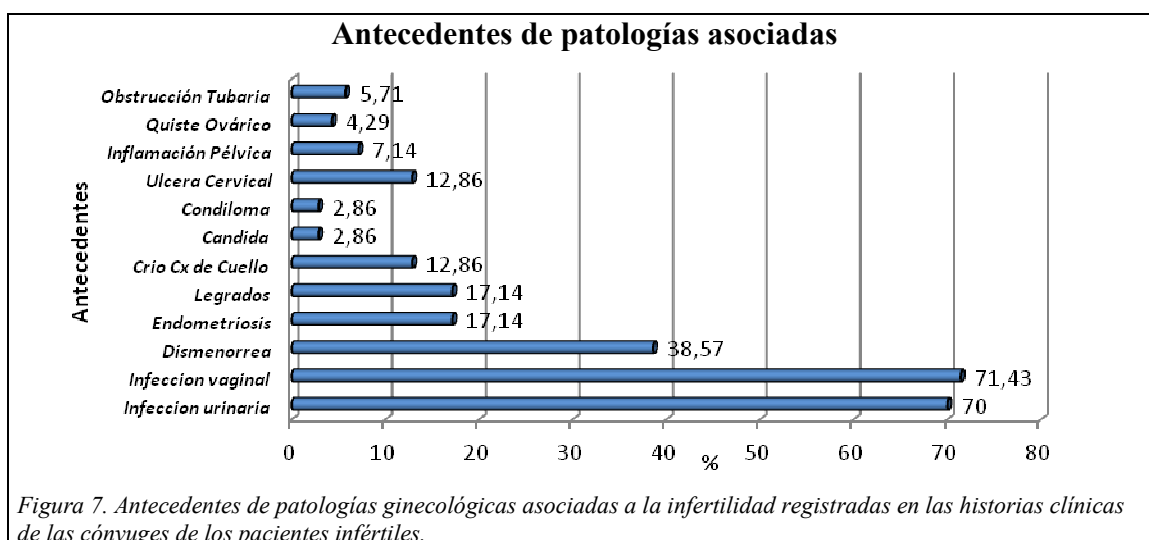
Respecto a las secuelas cicatriciales estudiadas, que se recogieron en función a evidencias clínicas, y con apoyo de ecografía pélvica e histerosalpingografía, fueron la presencia de: distopia uterina, enfermedad pélvica inflamatoria crónica, endometriosis y lesiones tubarias, estando presentes uno o más de estos hallazgos en el 89,06% de las pacientes. Solo 6 pacientes (9,38%) presentaron falla ovárica que fue calificada como leve en 4 casos y moderada en 2 pacientes.

Otras patologías asociadas que se registraron en las historias clínicas ginecológicas incluyeron: infección vaginal recurrente (71,43%), infecciones urinarias (70%), y endometriosis (17,14%), como entidades mayormente reportadas. Figura 7

El síntoma que reportaron las pacientes con mayor frecuencia fue el dolor pélvico (65,71%), seguido de leucorrea (58,57%), dismenorrea (38,57%) y ardor vaginal (31,43%). Con menor frecuencia se encontraron síntomas como prurito vaginal (29%), disuria (28,57%), dispareunia (24,29%), y polaquiuria (17,14%). Figura 6



La información clínica se complementó con el diagnóstico microbiológico en exudado cérvico-vaginal y exfoliado del endocérvix; una vez que se estableció el diagnóstico de infección genitourinaria, se asignó el tratamiento antibiótico específico y antioxidante, a la par del tratamiento del cónyuge. Todos los casos analizados fueron sometidos a un período de seguimiento a lo largo del cual y, en tiempos concretos, se les realizó exploración clínica y recogida de muestras para los diferentes exámenes de laboratorio. La duración del seguimiento fue de seis meses después de finalizado el tratamiento.



5.1.3 Evaluación microbiológica

Mientras que en el grupo control, la prueba de IFD fue negativa para *C. trachomatis*, el 100% de los pacientes tenían infección genital interna por ésta bacteria, detectándose más de 10 cuerpos elementales fluorescentes en los concentrados celulares de las muestras de líquido seminal. Por la misma técnica se estudiaron las muestras de exudado cérvico-vaginal de 64 de las cónyuges de los pacientes, obtenidas durante las entrevistas clínicas y previas a la asignación de tratamiento antibiótico. Bajo el mismo criterio de positividad, todas esas muestras, excepto una, fueron informadas como clamidia-positivas. Los resultados de las observaciones de inmunofluorescencia aplicadas a las muestras seminales se muestran en la Figura 8.

Chlamydia trachomatis - Inmunofluorescencia directa

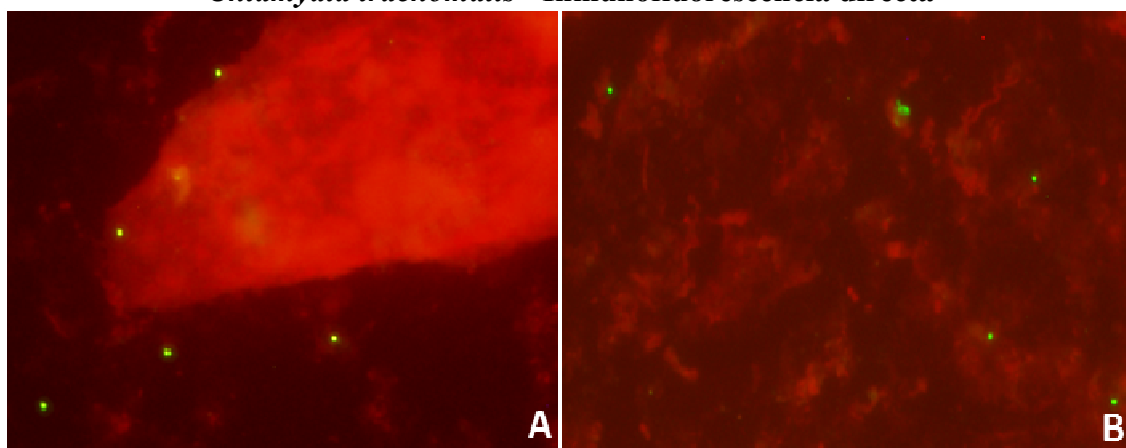


Figura 8 . Detección de *C. trachomatis* con Anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína contrastados con Azul de Evans. En la figura de la izquierda se observa una célula epitelial de la uretra presente en el líquido seminal de paciente, se observan cuerpos elementales verdes sobre un fondo de contraste rojo (azul de Evans) el cual es afín a los restos del citoplasma.

Todas las muestras seminales analizadas eran portadoras de bacterias de la especie *Mycoplasma*, de acuerdo a los resultados del cultivo en medios selectivos. En una gran proporción de las muestras de pacientes (72,86%), se aisló e identificó *Ureaplasma urealyticum*; las muestras seminales de 12 pacientes (17,14%) estaban infectadas por dos especies de *Mycoplasmas*: *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*; solo en un paciente se aisló solamente *Mycoplasma hominis*, en 6 (8,57%) el cultivo indicó la presencia de bacterias de la especie *Mycoplasma* sin poder identificar a qué especie pertenecía (Figura 9). En ninguno de los cultivos de muestras de voluntarios fértiles (28) se registró crecimiento para *Mycoplasma sp.* para ninguna de las muestras seminales analizadas. La comparación estadística de los resultados en la prueba de *C. trachomatis* y en el cultivo de *Mycoplasma sp.* indicó que las diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes fueron significativas ($p=0,0001$).

Diagnóstico de *Mycoplasma* sp. en líquido seminal



Figura 9. Diagnóstico de *Mycoplasma* sp. Identificación microbiológica de *Mycoplasma* sp. en líquido seminal de los pacientes infértiles, sistema de identificación bioquímica (MYCOPLASMA IST 2), Imagen izquierda superior: Identificación del cultivo positivo para *Mycoplasma* sp y *Ureaplasma urealyticum*. Imagen izquierda inferior: Identificación del cultivo positivo para *U. urealyticum*. La imagen de la derecha corresponde a colonias bacterianas de *Mycoplasma* sp. observadas a 1000x en microscopio de campo claro.

Las 64 muestras de exudado cérvico vaginal se cultivaron también para aislamiento e identificación de Micoplasmas resultando positivos 59 cultivos (92,19%) de éstos, en el 86,44% correspondieron a *U. urealyticum*. Fue posible identificar *M. hominis* en 5 muestras (8,48%) y en 3 (5,08%) muestras, solo se llegó al diagnóstico de *Mycoplasma* sp. (Tabla III)

| Resultados de cultivo microbiológico para la identificación de <i>Mycoplasma</i> sp | | | |
|---|-------------|---|--------------|
| Hombre (n=70) | | Mujeres (n= 64) | |
| Total de casos positivos | 70 (100%) | Total de casos positivos | 59 (92,19%) |
| • <i>Mycoplasma</i> sp. | 6 (8,57%) | • <i>Mycoplasma</i> sp. | 14 (21,86 %) |
| • <i>Mycoplasma hominis</i> | 1 (1,43%) | • <i>Mycoplasma hominis</i> | 3 (4,69%) |
| • <i>Ureaplasma urealyticum</i> | 51 (72,86%) | • <i>Ureaplasma urealyticum</i> | 47 (73,45) |
| • <i>M. hominis</i> y <i>U. ureayiticum</i> | 12 (17,14%) | • <i>M. hominis</i> y <i>U. ureayiticum</i> | 0 |

Tabla III. Resultados de cultivo microbiológico para la identificación de *Mycoplasma* sp. en muestras de líquido seminal y en exudado cérvico vaginal.

Mediante cultivo microbiológico aeróbico y anaeróbico que se pudo realizar en 58 de las muestras de líquido seminal, se detectó la coexistencia de gérmenes como, *Staphylococcus aureus* (17casos), *Staphylococcus epidermidis* (15 casos), *Micrococcus* sp. (9 casos), *Streptococcus agalactiae* (2 casos), *Cándida albicans* (2 casos), y *Klebsiella oxytoca* (1caso), *Escherichia coli* (1 caso), *Streptococcus viridans* (1 caso).

Como complemento de las pruebas microbiológicas, las observaciones hechas mediante el examen citológico en fresco a 1000 aumentos y con la aplicación de colorantes supra vitales en extensiones en capa fina del líquido seminal y exudado cérvico vaginal, se utilizaron para obtener la concentración bacteriana de Clamidias y Micoplasmas de acuerdo a los criterios morfológicos descritos en el capítulo de material y métodos.

Todas las muestras seminales contenían cuerpos elementales de clamidia en distinta cuantía, el 60% en cantidad moderada, 34,29 % en cantidad escasa y 5,71% en cantidad abundante. Se informó de la existencia de cuerpos reticulares de clamidia en la mayoría de las muestras en cantidad escasa: 67,14%, y en menor número de muestras se consideraron presentes en cantidad moderada: 22,86 y abundante en el 1,43%. En 6 (8,57%) de las muestras seminales analizadas no se observaron cuerpos reticulares.

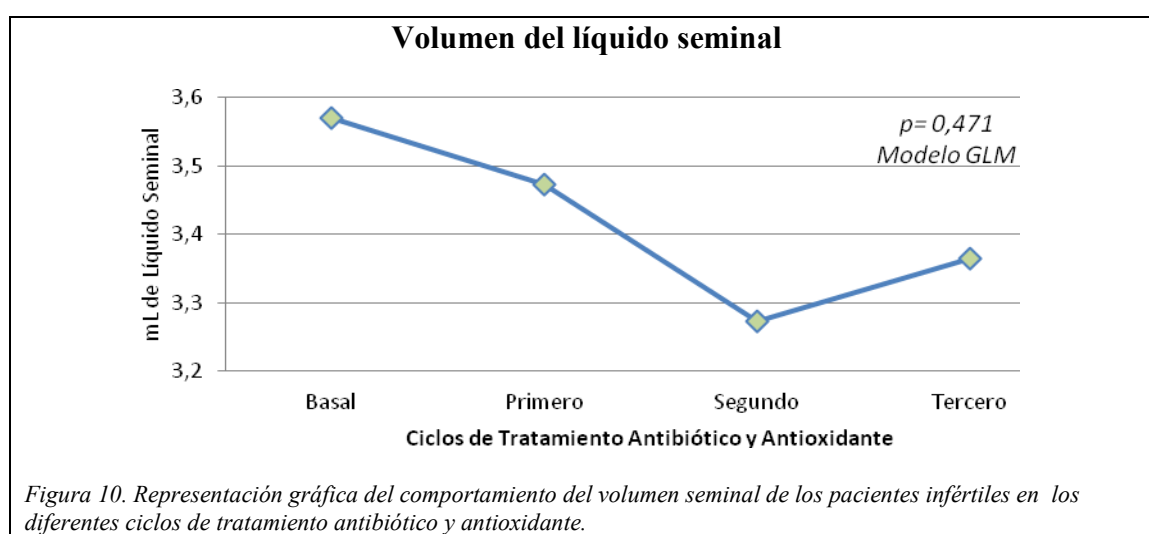
Respecto a la presencia de bacterias de morfología compatible con la especie *Mycoplasma*, en todas las muestras de pacientes excepto en una se observaron estas bacterias: 62,86% en cantidad moderada; 27,14% en cantidad escasa; 8,57% en cantidad abundante. En el grupo control no se observaron bacterias con características compatibles con *Mycoplasma sp.*

5.2 Patología seminal y espermática: controles, pacientes y efecto del Tratamiento

5.2.1 Análisis del líquido seminal

5.2.1.1 Parámetros físico-químicos del líquido seminal

En todos los casos el volumen del líquido seminal se encontró dentro del rango referido como normal por la OMS (2-6,5ml). La comparación de esta variable entre ciclos mostró diferencias significativas ($p < 0,05$, *t-student*). El volumen promedio fue: Controles 3,35 ml; Basal 3,57 ml; Primer ciclo 3,47 ml; segundo ciclo 3,27 ml y para el cuarto ciclo fue de 3.36 ml. Las variaciones de este parámetro a lo largo del tiempo (ciclos) no fueron significativas ($p = 0,471$; GLM). Los valores calculados se presentan en la Figura 10.

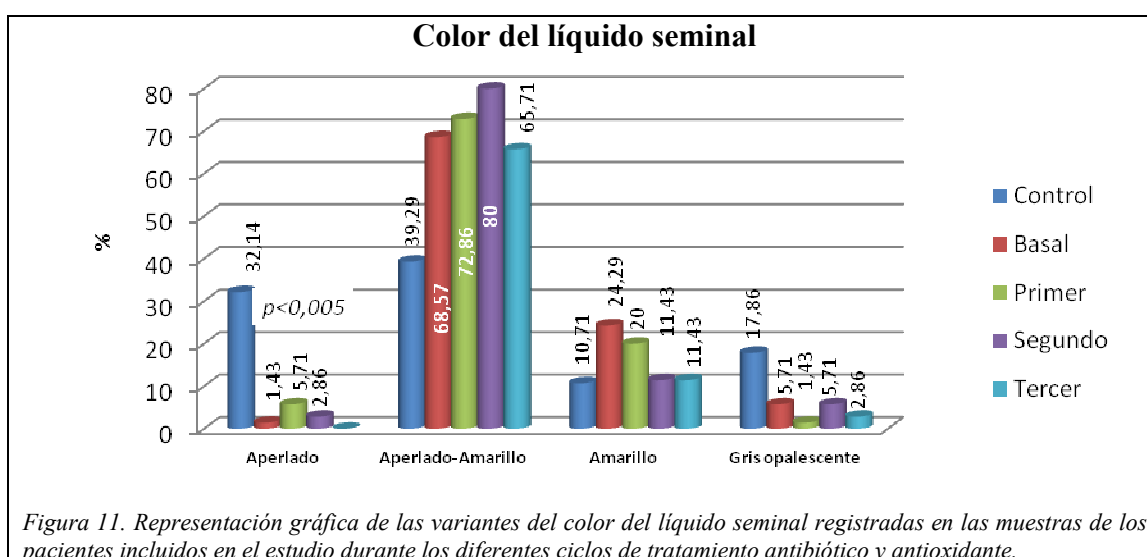


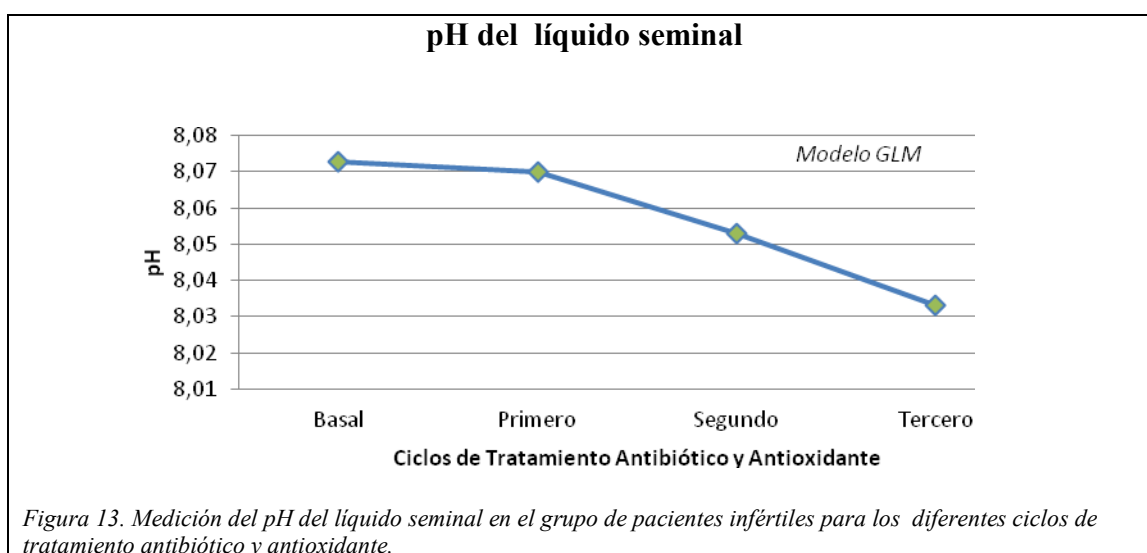
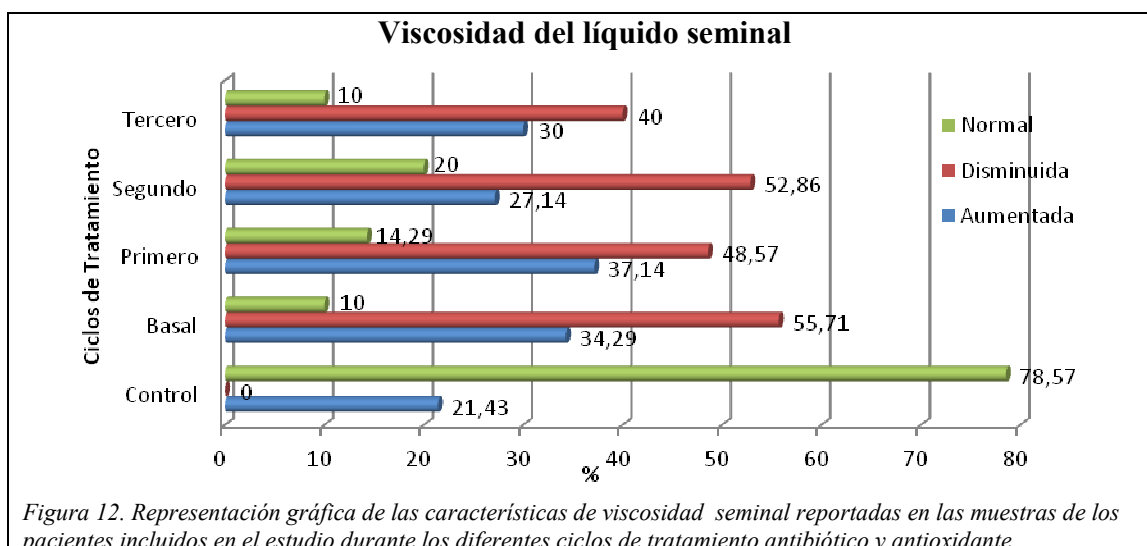
El Color del líquido seminal fue definido mediante las siguientes cuatro modalidades: aperlado, aperlado-amarillo, amarillo y gris opalescente. En el grupo

control predominó el líquido seminal de color aperlado (32,14%) y aperlado-amarillento (39,29%); en menor número de muestras se observó el color amarillo (10,71%) y gris opalescente (17,78%). En el grupo de pacientes las muestras seminales presentaron color aperlado amarillento que fue cambiando a blanco aperlado a lo largo del tratamiento. Los resultados de ésta evaluación se muestran en la Figura 11.

La viscosidad seminal se clasificó como: normal, aumentada y disminuida, registrándose un predominio de normalidad en el grupo control. En el grupo de pacientes la mayor frecuencia correspondió a la modalidad de viscosidad anormal, tanto aumentada como disminuida. En éste aspecto de la calidad del líquido seminal, no se observaron cambios que fueran significativos estadísticamente con el tratamiento. (Figura 12)

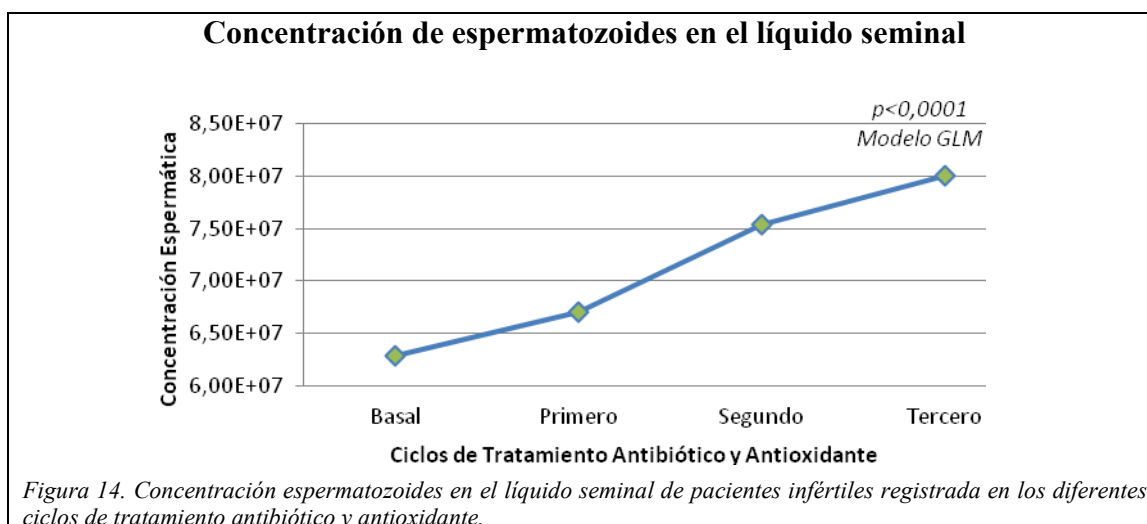
La medición del pH seminal se realizó en los primeros minutos una vez que la muestra seminal se licuó. Tanto en el grupo control como en el de pacientes, los valores registrados estuvieron cerca del límite superior de normalidad (7,2-8,0). Sin embargo, las cifras más altas de pH se vieron en el grupo de pacientes apreciándose una elevación en esta variable después del primer ciclo de tratamiento. Cuando los valores se expresan a través de la media aritmética no se encontraron diferencias entre el grupo control (7,94), y la lectura basal del grupo de pacientes (8,07). Aunque las diferencias detectadas a lo largo del tratamiento tampoco fueron estadísticamente significativas, se observó una disminución posterior al segundo y tercer ciclo de tratamiento en los valores del pH seminal. (Figura 13)





5.2.1.2 Concentración de espermatozoides

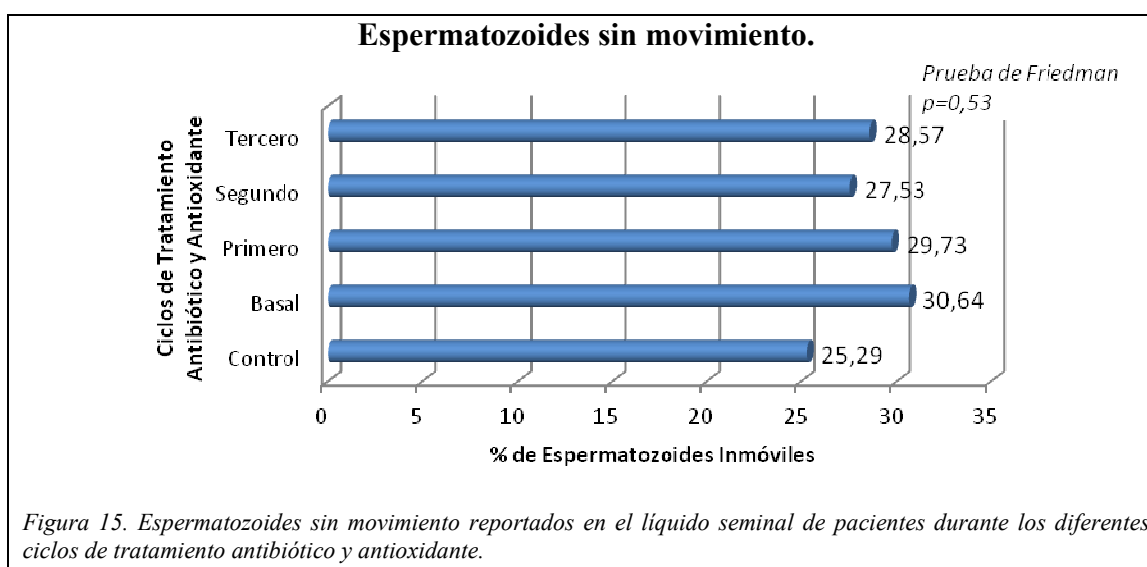
El conteo de espermatozoides del eyaculado se realizó sistemáticamente una hora después de haberse obtenido la muestra, la concentración media de espermatozoides en el grupo de pacientes en la muestra basal fue de $(62,893 \times 10^6 \text{ Millesp/ml} \pm 41,857 \times 10^6)$, mientras que en el grupo control fue de $(76,143 \times 10^6 \text{ Millesp/ml} \pm 32,017 \times 10^6)$. El análisis inferencial aplicado a esta variable no mostró diferencias significativas ($p=0,1$; *t-student*) entre el grupo control y la cifra de espermatozoides de los pacientes en el análisis basal. La concentración de células evaluadas en los tres ciclos de tratamiento no presentó diferencias de importancia. La concentración de espermatozoides se incrementa a medida que aumentan los ciclos de tratamiento comprobando estos cambios cuando se analizaron los valores con el modelo lineal general GLM para muestras repetidas ($p<0,0001$). (Tabla IV Anexo) (Figura 14)



5.2.1.3 Motilidad espermática

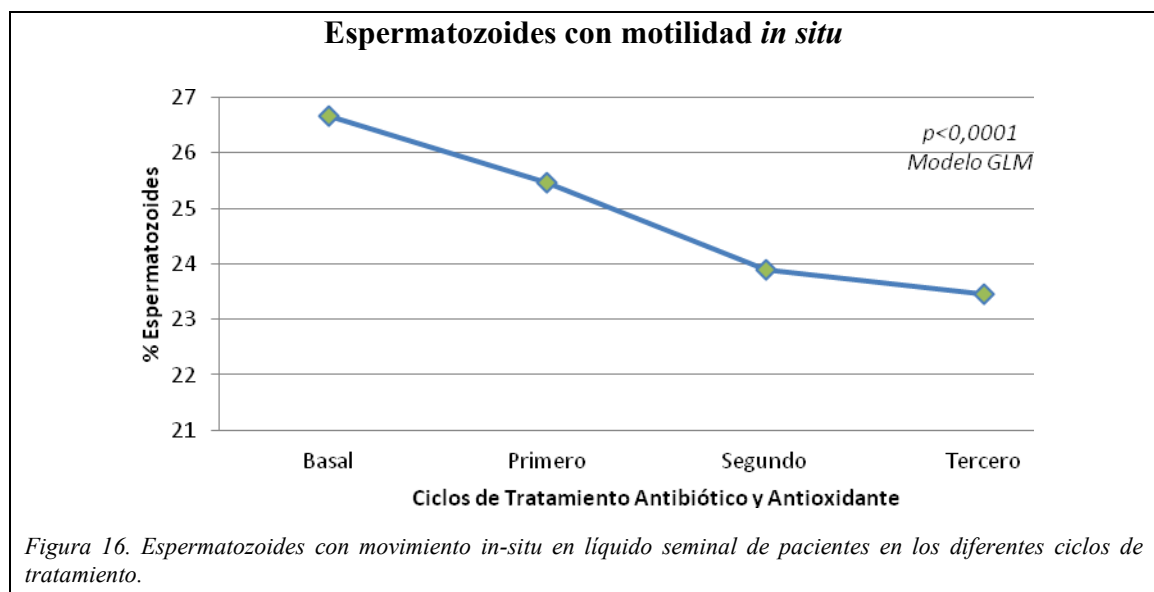
El análisis del movimiento de los espermatozoides se clasifica en 5 niveles o grados: espermatozoides sin movimiento, espermatozoides con movimiento vibratorio o *in situ*, espermatozoides con movimiento progresivo curvilíneo, espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo y motilidad progresiva total.

La media de espermatozoides sin movimiento fue de $25,29 \pm 6,40$ para el grupo control y $30,64 \pm 11,66$ para la muestra basal de los pacientes; $29,73 \pm 12,67$ de los espermatozoides carecían de movilidad en la muestra del primer ciclo, $27,53 \pm 10,85$ en el análisis seminal posterior al segundo ciclo de tratamiento y $28,57 \pm 11,38$ para la muestra correspondiente al tercer ciclo de tratamiento. Esta variable comparada con el control presenta diferencias significativas para los tres ciclos de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*), pero el número de espermatozoides sin movimiento no presenta mejoría con el tiempo ($p = 0,53$; *Prueba de Friedman*). (Tabla IV anexo) (Figura 15)



La motilidad espermática vibratoria o *in-situ* observada en el grupo de pacientes en la muestra basal registró una media de $26,66 \pm 8,34$ que comparada con la del grupo control de 7,21% no fue significativa ($p > 0,05$; *t-student*).

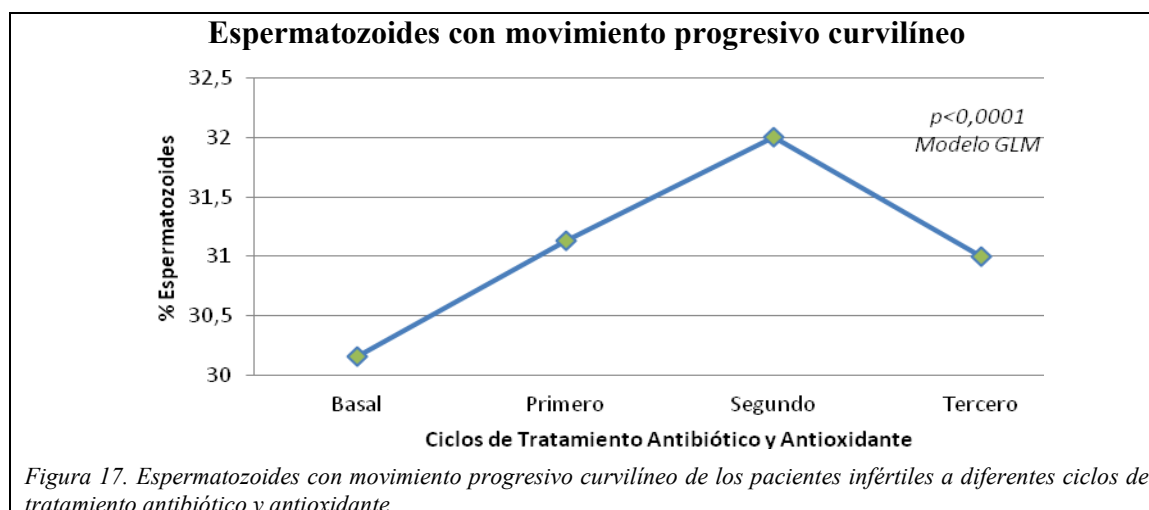
En las evaluaciones hechas después del primero, segundo y tercer ciclo de tratamiento este parámetro permaneció sin cambios significativos, pero se observó una disminución estadísticamente significativa, de ésta clase de movimiento espermático, con el avance de los tratamientos ($p < 0,0001$; GLM. (Tabla IV Anexo) (Figura 16)



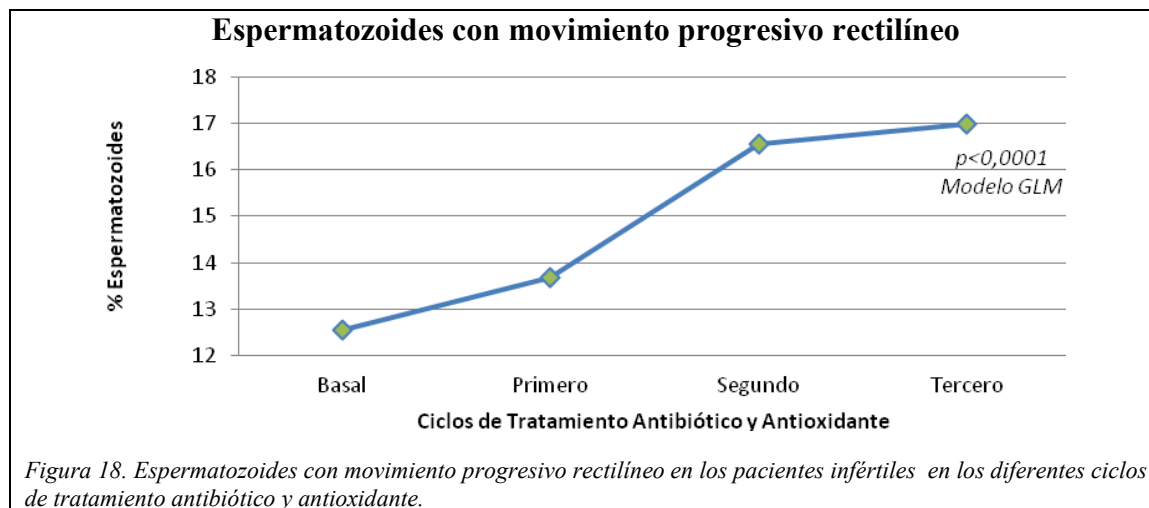
El desplazamiento progresivo de los espermatozoides es uno de los parámetros seminales que se relaciona *a priori* con el potencial fértil del hombre. Los dos patrones de desplazamiento progresivo, curvilíneo y rectilíneo fueron evaluados, tomando para éste estudio solo el análisis hecho a la hora de haber sido obtenida la muestra seminal.

Para el movimiento progresivo curvilíneo, los valores en la muestra basal y primer ciclo de tratamiento presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan con el control ($p < 0,05$; *t-Student*).

El segundo y tercer ciclo no presentan cambios evidentes. Cuando se analiza su comportamiento a través del tiempo se observa incremento en la motilidad ($p < 0,0001$; GML). (Tabla IV Anexo) (Figura 17).

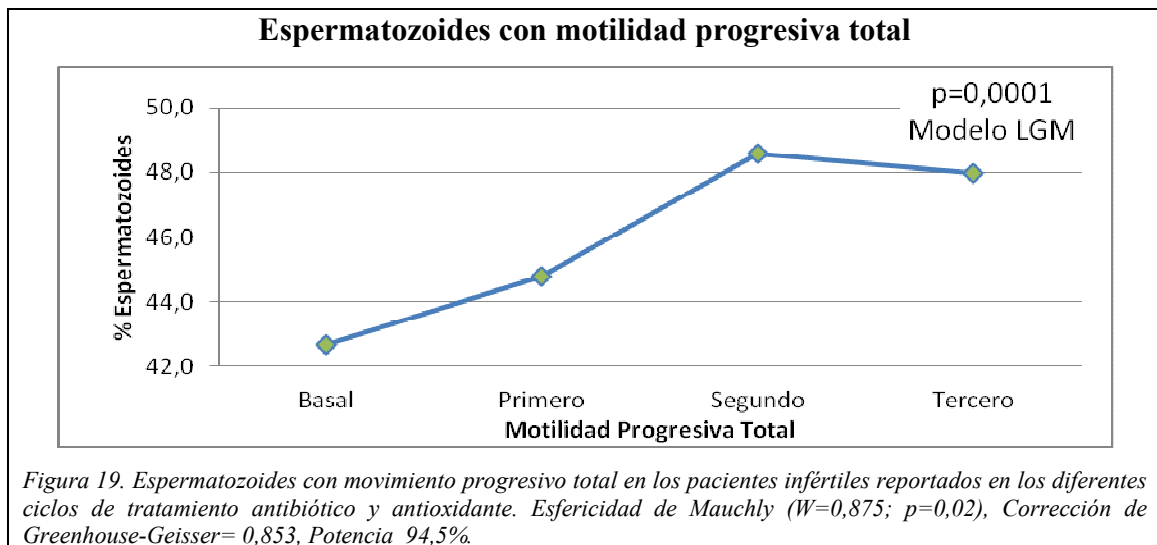


Comparativamente con el grupo control, el desplazamiento rectilíneo, registrado en el grupo de pacientes y analizado mediante la *t de Student*, muestra cambios de importancia en el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p < 0,0001$), mientras que en la muestra basal y primer ciclo no existen diferencias significativas. Al analizar este patrón de desplazamiento mediante el modelo lineal general, observamos que el incremento en el movimiento rectilíneo, conforme avanza el tratamiento, es estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). (Tabla IV Anexo) (Figura 18)



La motilidad progresiva total por su definición, la suma de los valores de motilidad progresiva curvilínea y rectilínea equivale al movimiento progresivo total de los espermatozoides. Nuestros análisis indican que éste parámetro muestra diferencias estadísticamente significativas, cuando se compara los resultados de la muestra basal con el control ($p < 0,0001$; *t-student*). Observamos también que definitivamente se incrementó la motilidad espermática en el grupo de pacientes cuando se sometieron a

mayor número de ciclos de tratamiento, mostrando diferencias significativas cuando se compararon los valores obtenidos ($p=0,0001$; GLM). (Figura 19)



5.2.1.4 Vitalidad espermática

Otro de los aspectos de calidad espermática evaluados en nuestro estudio fue la vitalidad de los espermatozoides. El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó en base a la exclusión de la Eosina Y al 1%, en solución fisiológica. La medición se hizo una hora después de la obtención de la muestra (Figura 20). Los promedios de células vivas encontradas fueron del $88,21 \pm 4,12$ para el grupo control; $82,03 \pm 4,57$ para la muestra basal; $81,91 \pm 8,56$ para el primer ciclo; $83,63 \pm 4,69$ para el segundo ciclo y para el tercer ciclo se reportó $83,52 \pm 4,15$. Las diferencias registradas no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los ciclos (Tabla IV Anexo). Al realizar el análisis estadístico teniendo en cuenta el tiempo encontramos que existían cambios significativos de la variable a lo largo de los ciclos de tratamiento. ($p=0,0001$; GLM). (Figura 21)

Vitalidad espermática

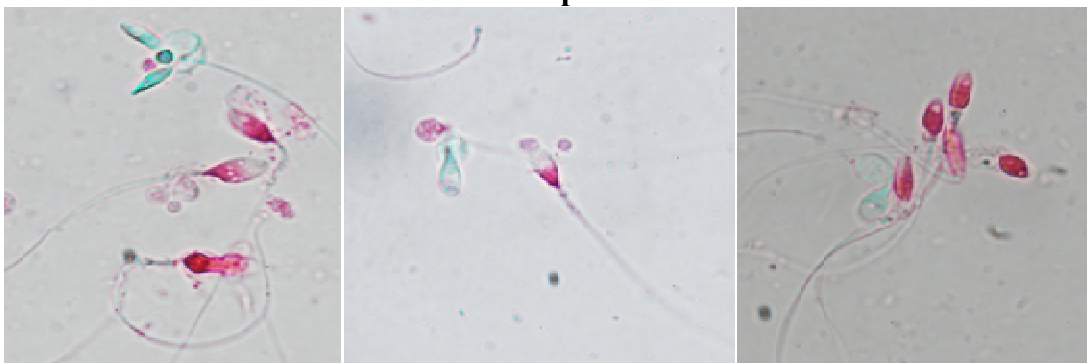
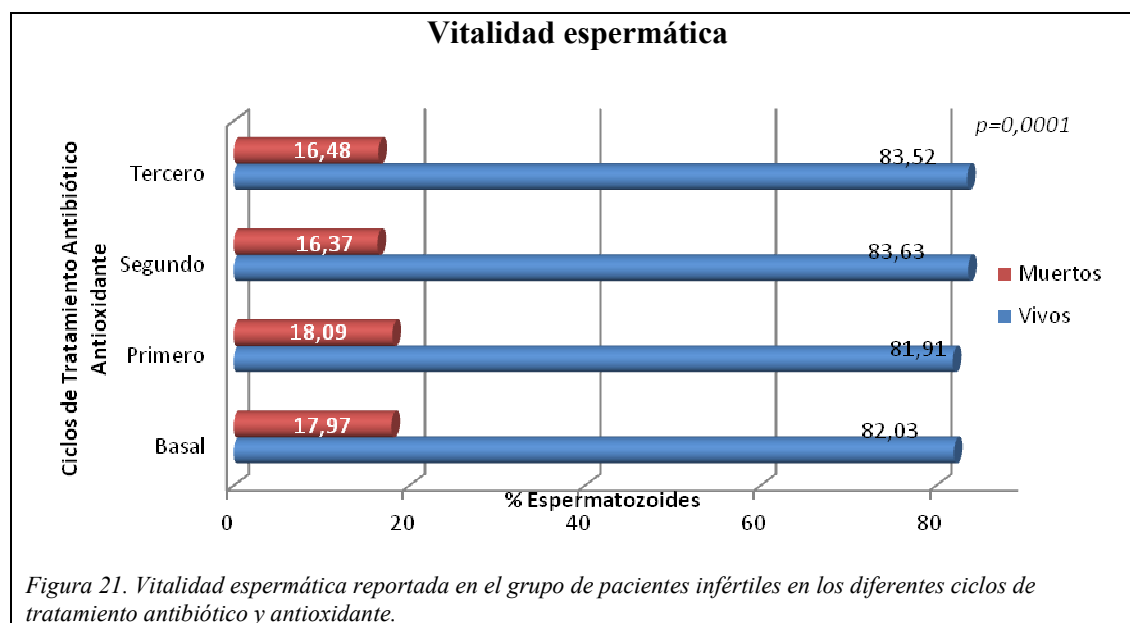


Figura 20. Vitalidad espermática del grupo de pacientes infértiles reportada en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Espermatozoides vivos (transparentes y sin contraste); espermatozoides muertos (color rojo). Microscopia de campo claro, 100x



5.2.1.5 Parámetros citológicos asociados a inflamación

El examen microscópico de la muestra seminal nos permitió el registro y descripción de otras células, principalmente inflamatorias y otros elementos morfológicos, entre los que resultaron de interés fragmentos citoplásmicos provenientes de la autólisis que acompaña al proceso infeccioso y la respuesta inflamatoria. Estos *detritus celulares*, se observaron en cantidad moderada, en todas las muestras de líquido seminal de los pacientes, mientras que solo 8 de las muestras de los hombres del grupo control contenían fragmentos o restos citoplásmicos. A medida que se incrementa el número de ciclos de tratamiento, la concentración de restos celulares en el líquido seminal de los pacientes fue disminuyendo. (Figura 22 y 27) (Tabla V anexo)

Tomando en cuenta que en las descripciones microscópicas rutinarias se informa sobre la presencia de células redondas observadas a 400 aumentos en el microscopio óptico, en nuestro estudio incluimos éstas observaciones como un parámetro a analizar indicando su presencia en número de células por campo microscópico.

La media en el grupo control fue de $1,89 \pm 1,50$ y en la muestra seminal basal del grupo de pacientes fue de $2,77 \pm 1,41$ células/campo, un valor de $2,96 \pm 1,54$ células/campo para el primer ciclo, $2,66 \pm 1,24$ células/campo para el segundo ciclo de tratamiento y $2,80 \pm 1,83$ células/campo para el tercer ciclo de tratamiento. Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ni comparando los diferentes momentos entre grupos y a lo largo de los ciclos. (Figura 23 y 27) (Tabla V Anexo)

Cuando analizamos los promedios de leucocitos obtenidos entre control y pacientes no se registraron diferencias significativas en ninguna de las lecturas de las muestras estudiadas. En cambio, si se observaron diferencias significativas a mayor número de ciclos de tratamiento ($p<0,0001$; *Prueba de Friedman*). (Figura 24 y 27) (Tabla V Anexo)

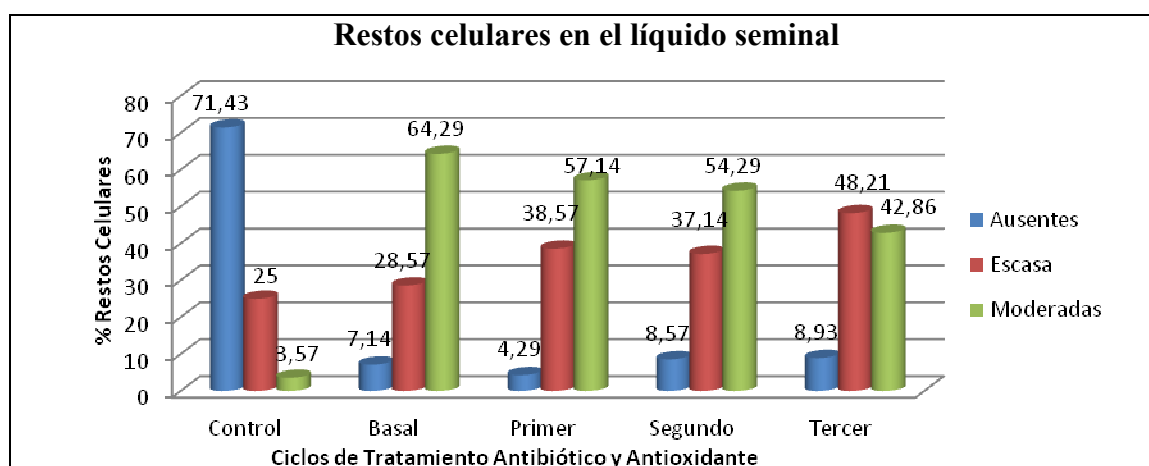


Figura 22. Presencia de restos celulares en el líquido seminal de pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

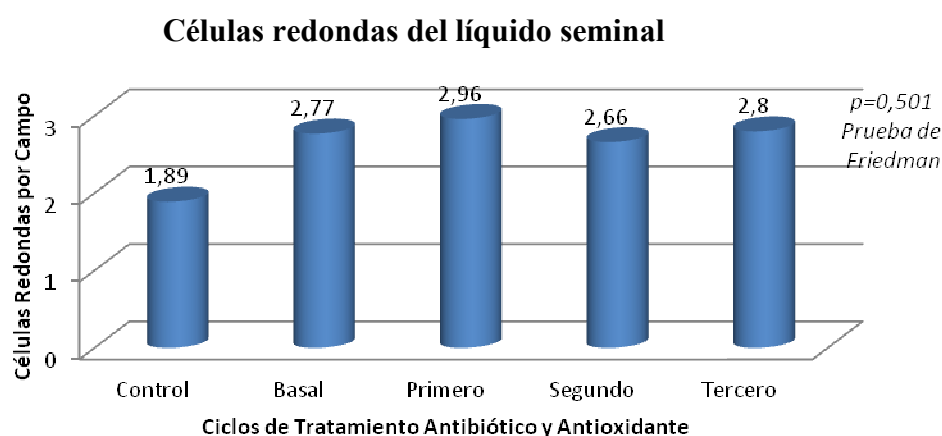


Figura 23. Presencia de células redondas por campo microscópico reportadas durante el análisis de los parámetros citológicos del líquido seminal de pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

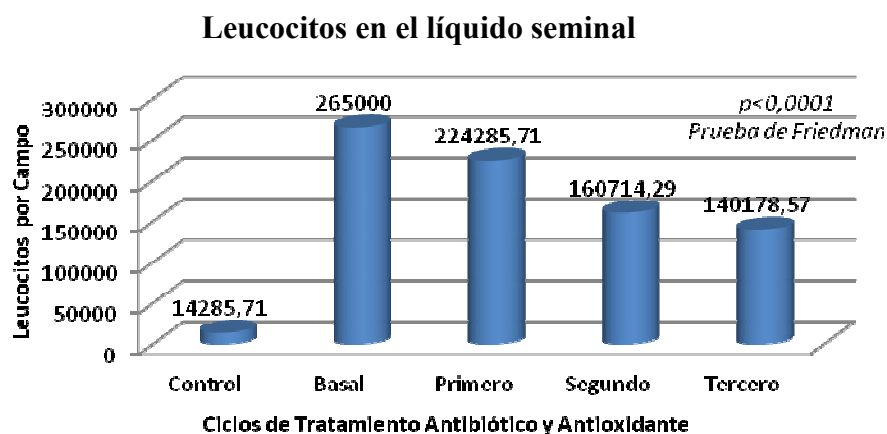
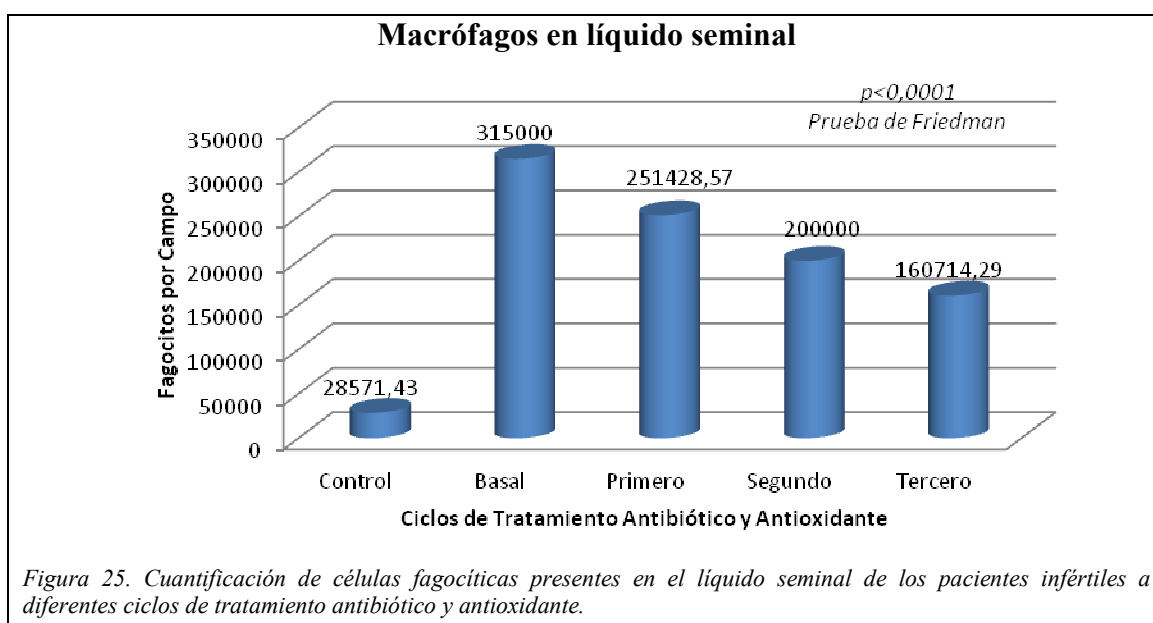
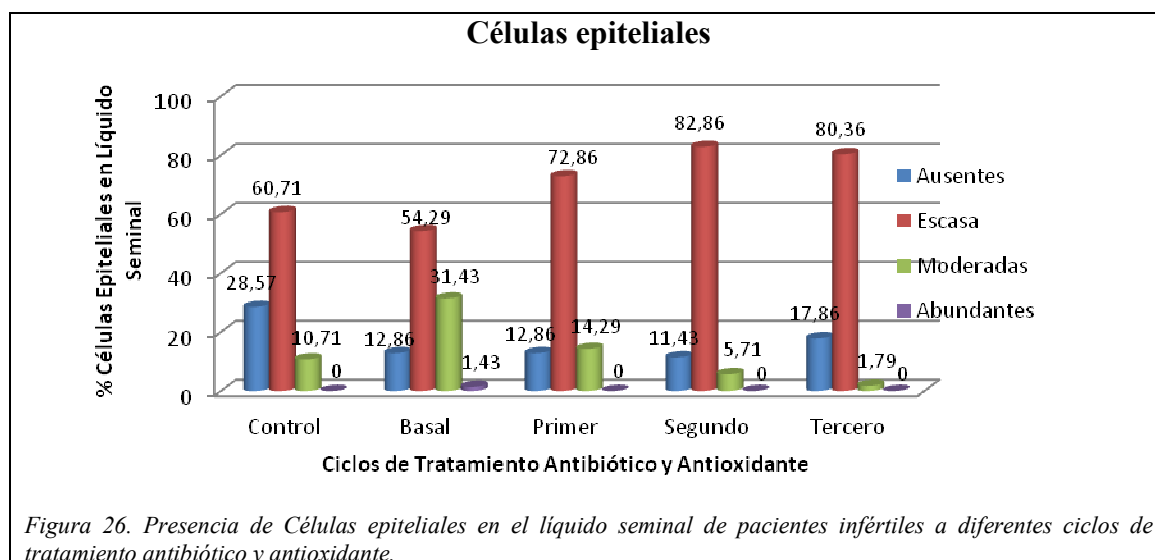


Figura 24. Cuantificación de leucocitos en el líquido seminal de los pacientes infértiles a diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

Los macrófagos analizados mediante la tinción de rojo neutro arrojan una media para la muestra seminal del grupo control de $28,571 \times 10^3 \pm 59,982 \times 10^3$ y para la muestra seminal basal de los pacientes el promedio fue: $315 \times 10^3 \pm 241,575 \times 10^3$; la cifra de fagocitos seminales después del primer ciclo de tratamiento fue de $251,428 \times 10^3 \pm 191,48 \times 10^3$ y de $200 \times 10^3 \pm 157,884 \times 10^3$ en la muestra posterior al segundo ciclo. Después del tercer tratamiento el número de fagocitos se redujo a $160,714 \times 10^3 \pm 165,889 \times 10^3$. Estas variables no mostraron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo control, pero si se observó claramente una reducción de las cifras al incrementarse el número de ciclos de tratamiento ($p < 0,0001$; GLM). (Figura 25 y 27) (Tabla V Anexo)



La presencia de células epiteliales esfaceladas de los conductos seminíferos fue una observación constante. Veinte de los voluntarios del grupo control presentaban en la muestra seminal exfoliación de células epiteliales, aunque en la mayoría de esos casos fue calificada como escasa. En porcentaje mayor y en mayor magnitud, las muestras seminales de los pacientes contenían células epiteliales, presentando concentración moderada en el 31,43% en la lectura basal. Fue notoria la disminución de la presencia de células epiteliales en el líquido seminal a medida que avanzó el tratamiento con antibióticos y antioxidantes, de tal forma que después del último ciclo de tratamiento solo se observaron en uno de los casos. (Figura 26 y 27)



Parámetros citológicos asociados a inflamación

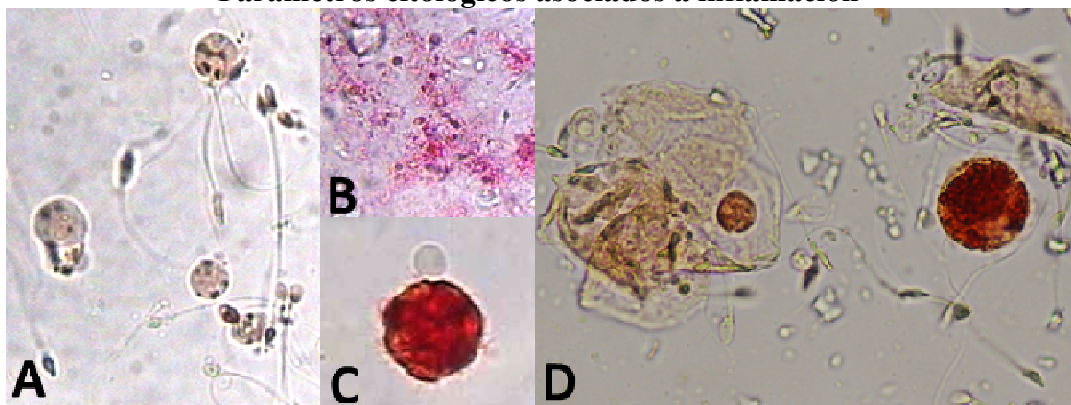
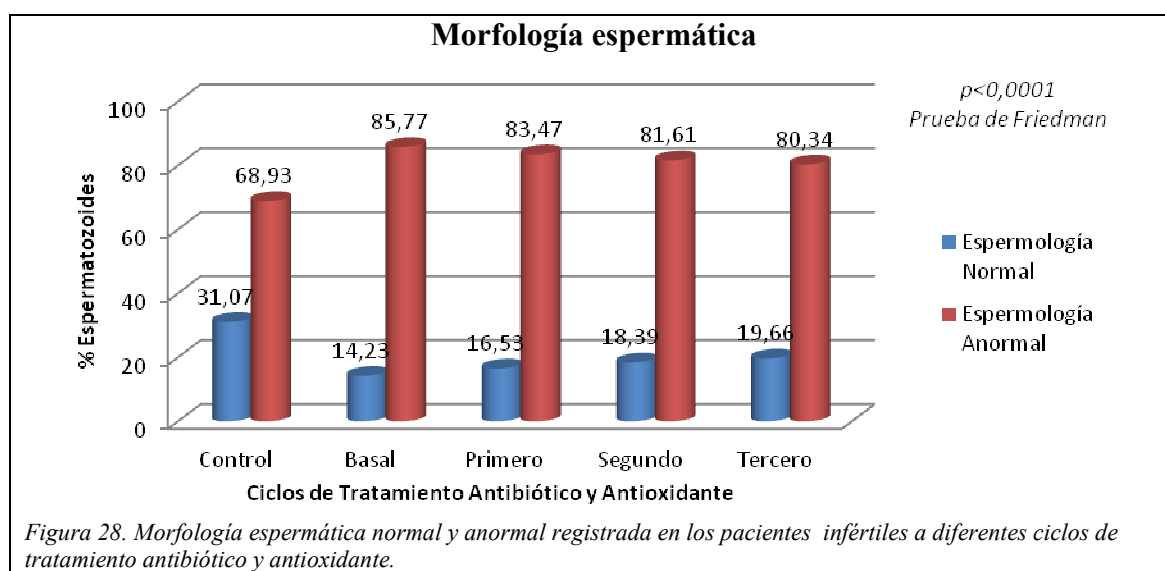


Figura 27. Parámetros citológicos asociados a inflamación observados en el líquido seminal de pacientes infértiles con infección por *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Observaciones en líquido seminal. **A.** Presencia de células redondas, tinción de rojo neutro. **B.** Detritus celulares, tinción de eosina amarilla. **C.** Leucocito peroxidasa positivo. **D.** Célula epitelial (izquierda) y macrófago (derecha) rojo neutro positivo. 1000x, Microscopio de campo claro.

5.2.2 Morfología del espermatozoide y fragmentación de la cromatina espermática

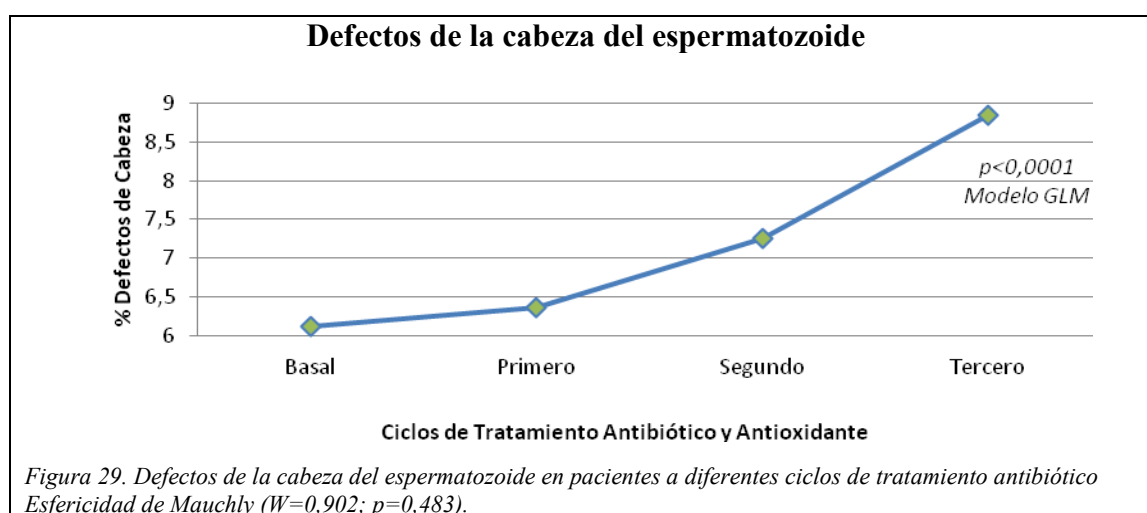
5.2.2.1 Morfología espermática

El promedio de espermatozoides calificados de forma normal en las muestras seminales del grupo control fue de 31.07 ± 2.76 , mientras que en el grupo de pacientes, para la muestra basal el valor fue de 14.23 ± 3.32 . Se compararon las medias de estos parámetros no encontrando diferencias significativas ($p=0.13$). Por otra parte cuando analizamos el comportamiento de los valores a través de los diferentes ciclos de tratamiento encontramos que el parámetro morfología normal sufre modificaciones estadísticamente significativas ($p<0.0001$; Prueba de Friedman). (Figura 28) (Tabla IV Anexo)



Analizamos los defectos morfológicos de la cabeza del espermatozoide los cuales incluyeron las siguientes alteraciones: microcéfalo, macrocéfalo, bicéfalo, piriforme y cabeza de alfiler. Estos prototipos fueron cuantificados de forma independiente y analizados en conjunto con el resto de alteraciones de la morfología seminal.

Al comparar los porcentajes de cabezas de espermatozoide morfológicamente defectuosas, presentes en el líquido seminal de los individuos del grupo control con la lectura basal del líquido seminal de los pacientes, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; *t-student*). Al comparar las medias del porcentaje de espermatozoides con cabeza de forma alterada de las muestras de pacientes analizadas en los diferentes tiempos de tratamiento, se encontraron diferencias estadísticamente significativas lo que implica que esta variable modifica su valor según avanza el tratamiento ($p < 0,0001$; *GLM*). (Figura 29 y 30) (Tabla VI-A y B, Anexo)



Morfología espermática. Defecto de la cabeza del espermatozoide

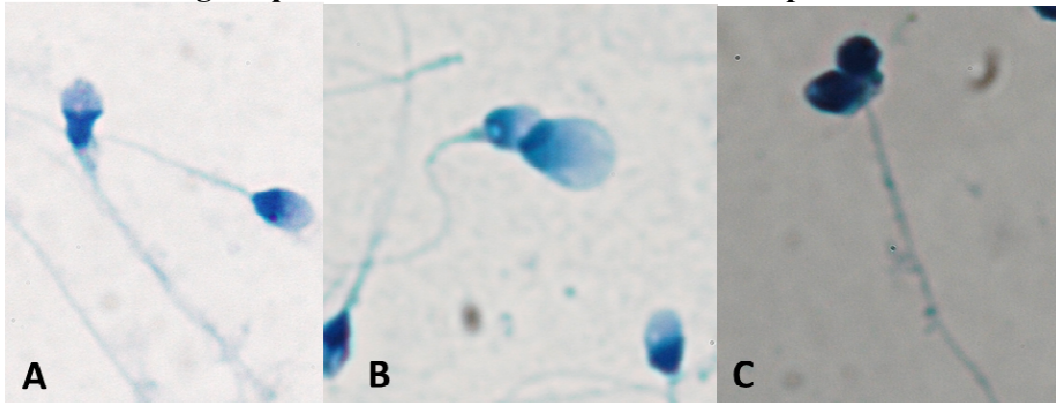


Figura 30. Morfología espermática. Defectos de la cabeza del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A. Espermatozoide piriforme B. Macrocéfalo C. Binucleado. Tinción de azul de metileno y verde brillante, 100x, Campo Claro.

Para la evaluación de defectos morfológicos del núcleo espermático consideramos los siguientes tipos de alteraciones: tamaño disminuido, elongación, binucleación, multinucleación, segmentación, descondensación y la presencia de vacuolas intranucleares.

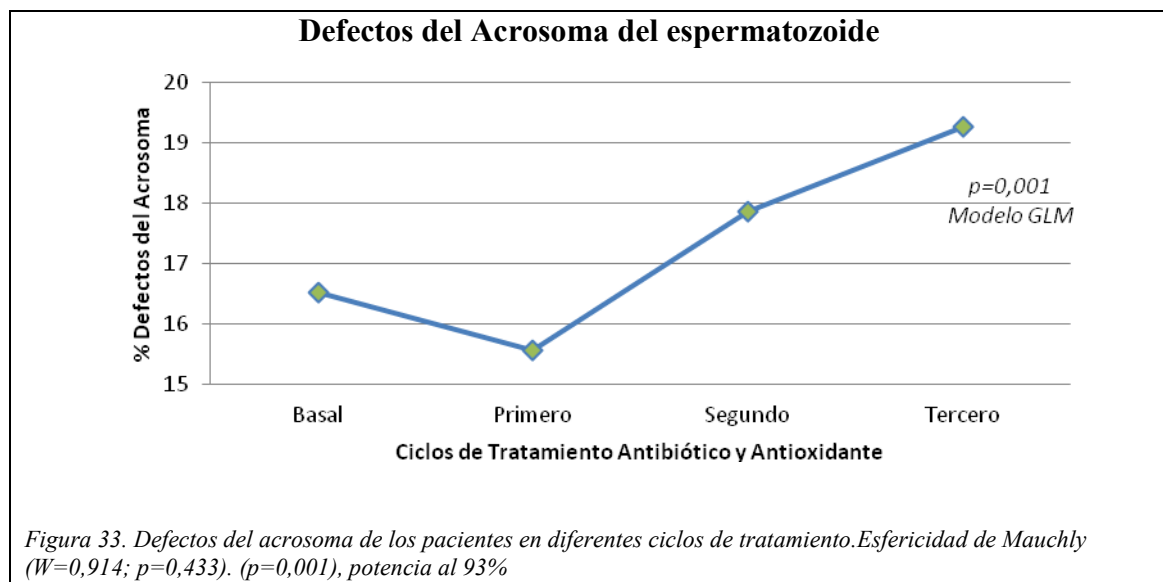
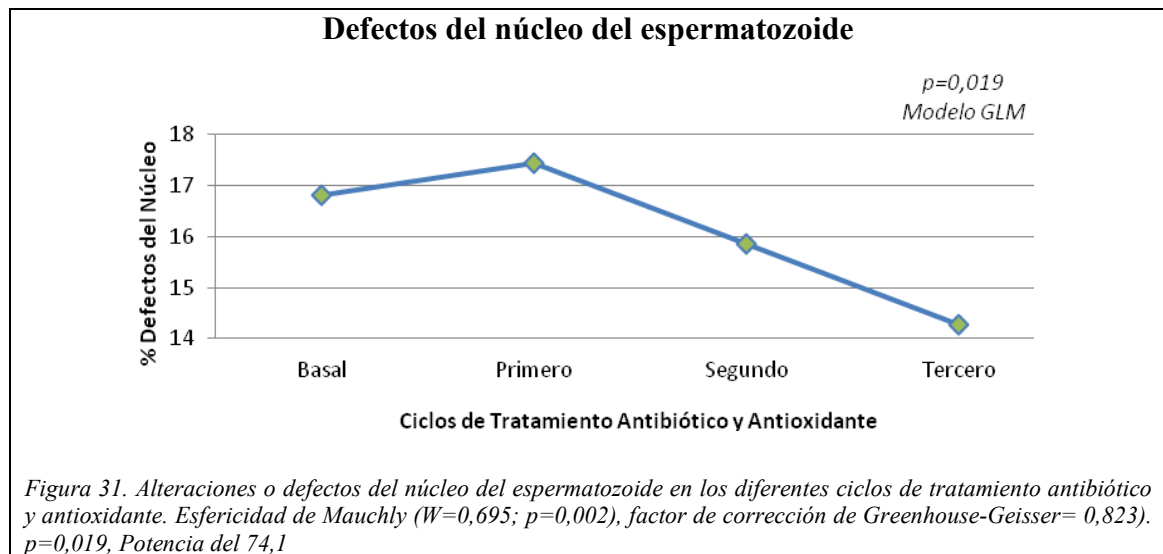
El análisis conjunto de las anomalías nucleares señaló que la muestra basal del grupo de pacientes presentó una media de $16,80 \pm 7,98$, mientras que la del control fue de $(13,04 \pm 7,11)$. La comparación estadística entre ambas estableció que la diferencia es significativa ($p < 0,05$; *t de Student*).

Al comparar las cifras medias de ésta variable a lo largo del tiempo de tratamiento mediante el GLM se encontraron diferencias significativas ($p = 0,019$). (Figura 31 y 32) (Tabla VII A y B, Anexo)

Respecto a los defectos del acrosoma del espermatozoide fueron considerados los siguientes variantes: área acrosomal $>70\%$, área acrosomal de 20 a 39 %, área acrosomal de $<20\%$, espermatozoide de cabeza redonda sin acrosoma, acrosoma vacuolado y espermatozoide de cabeza amorfa sin acrosoma.

Los valores promedio reportados para este parámetro en la muestra basal de líquido seminal de los pacientes ($16,53 \pm 7,78$), presentan diferencias significativas cuando se comparan con las del grupo control ($21,61 \pm 11,65$; $p < 0,005$; *t-student*).

Las alteraciones del acrosoma se presentaron con mayor frecuencia en el grupo control respecto a los pacientes. El valor promedio de los defectos del acrosoma se modifica significativamente a lo largo del tiempo ($p = 0,001$). (Figura 33 y 34) (Tabla VIII A y B, Anexo)



Morfología espermática. Defecto del núcleo del espermatozoide

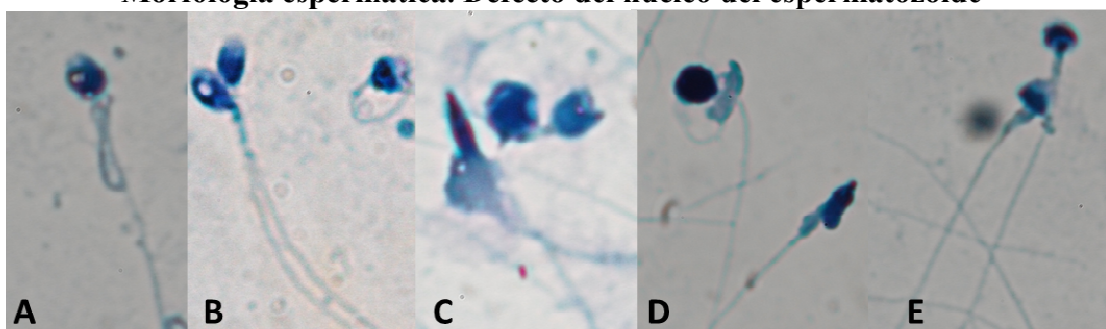


Figura 32. Morfología espermática. Defectos del núcleo del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A y B Núcleos vacuolados C. Núcleo elongado y núcleo con cromatina descompactada. D y E. Núcleo esférico y núcleos de forma irregular y descompactada. Tinción de azul de metileno y verde brillante, 100x, Campo Claro.

Morfología espermática. Defecto del acrosoma del espermatozoide

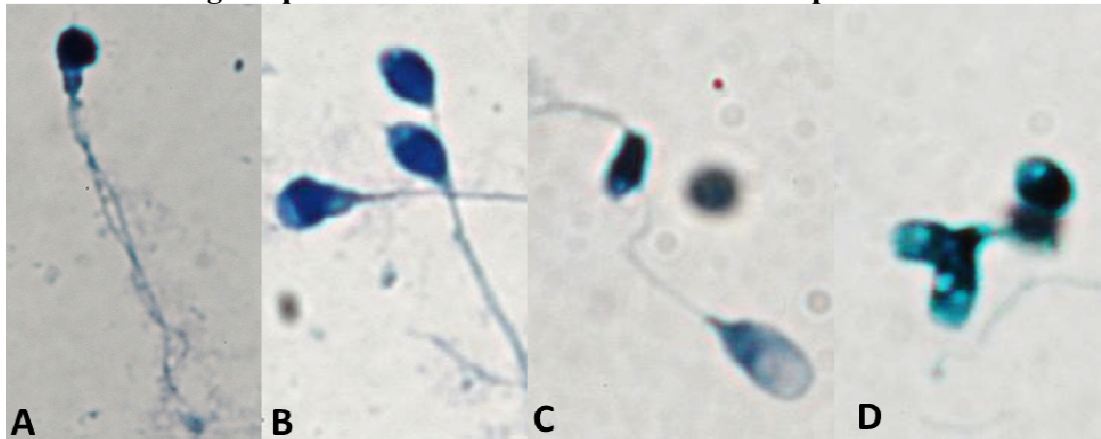
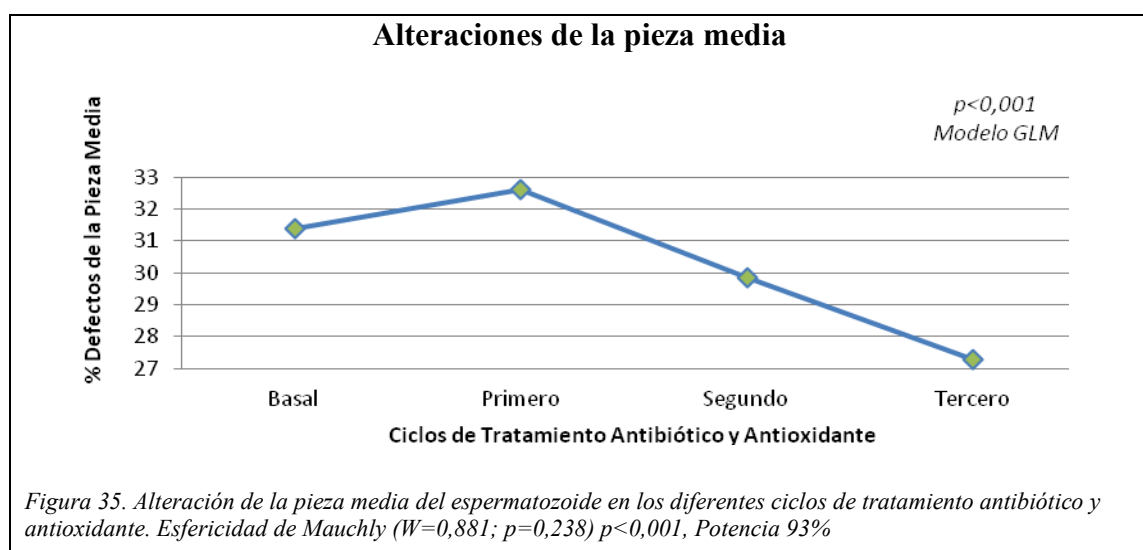


Figura 34. Morfología espermática. Defectos del acrosoma del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A. Espermatozoide biflagelado con pieza media gruesa y acrosoma ausente. B Espermatozoides con acrosomas disminuidos y flagelos gruesos. C. Espermatozoides con núcleo irregular y acrosoma disminuido (izquierda) y espermatozoide de acrosoma agrandado y vacuolado. D. Espermatozoides de núcleo degradado y vacuolado.

En la evaluación morfológica de la pieza media del flagelo del espermatozoide, se consideraron los siguientes tipos de alteraciones: engrosamiento de la pieza media, presencia de gota citoplásmica residual mayor que lo normal, pieza media engrosada y pieza media doblada.

Esta variable se presentó con menor frecuencia en el grupo de pacientes respecto a los controles, reportando medias para la muestra basal de $31,37 \pm 6,74$; y $38,32 \pm 12,76$ para el grupo control. Estos valores al compararlos la t-student mostraron diferencias significativas ($p < 0,005$). Al realizar el análisis entre la variable y el tiempo los resultados mostraron la existencia de diferencias significativas lo que implica que también esta variable modifica su valor según aumenta el tiempo de tratamiento ($p < 0,001$; GLM). (Figuras 35 y 36) (Tabla IX A y B, Anexo)



Morfología espermática. Defecto de la pieza media del espermatozoide

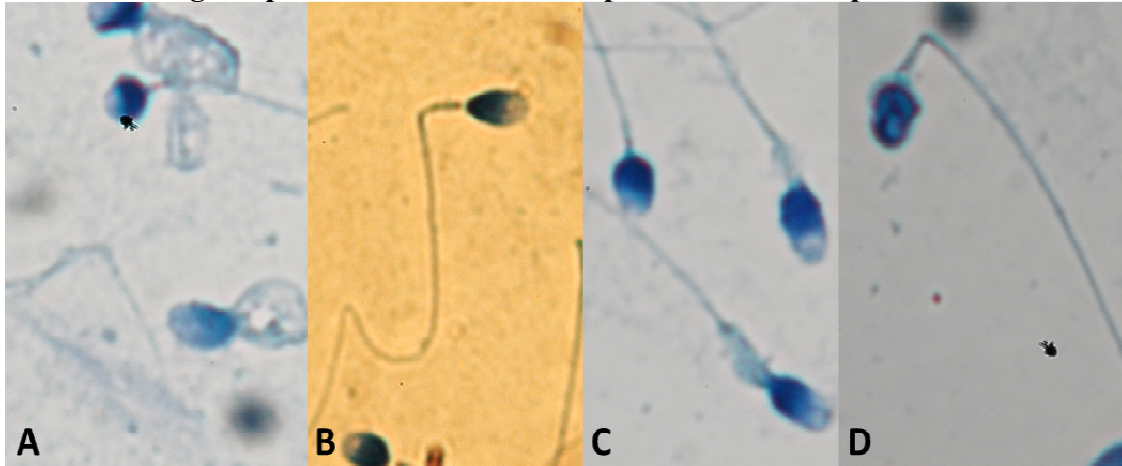


Figura 36. Morfología espermática. Defectos de la pieza media del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A. Espermatozoide con núcleos alterados y gota citoplásmica vacuolada. B Espermatozoide con acrosoma vacuolado y pieza media doblada. C. Espermatozoides con piezas medias engrosadas y defectos acrosomales. D. Espermatozoide con vacuolas nucleares y pieza media doblada.

Otro parámetro morfológico evaluado fue la presencia de defectos en la pieza principal del flagelo (enrollado, corto y engrosado). La media en el grupo de pacientes fue de 28,83% (basal), 27,61% (primer ciclo); 28,39%(segundo ciclo) y 28,91% para el tercer ciclo de tratamiento. Contrastando el valor de la muestra basal y el del grupo control se observan diferencias significativas ($p < 0,05$; *t-student*). Al analizar el comportamiento de la variable en el tiempo, no se pudo demostrar la existencia de diferencias significativas ($p = 0,764$; GLM). (Figura 37 y 38) (Tabla X A y B, Anexo)

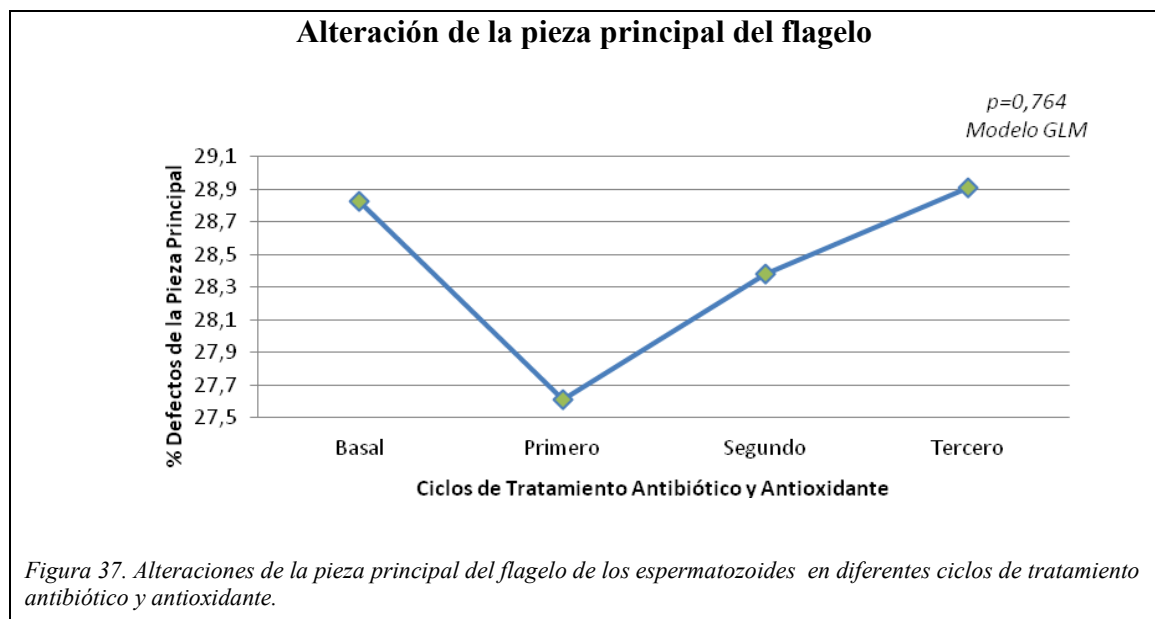


Figura 37. Alteraciones de la pieza principal del flagelo de los espermatozoides en diferentes ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

Morfología espermática. Defecto de la pieza principal del espermatozoide

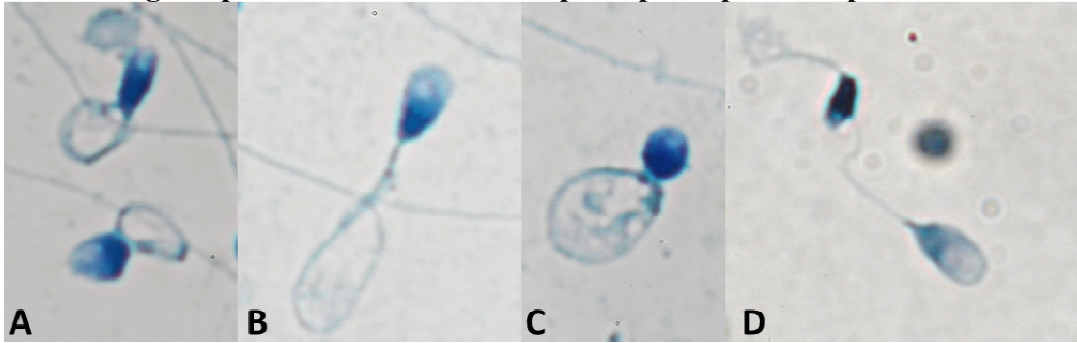
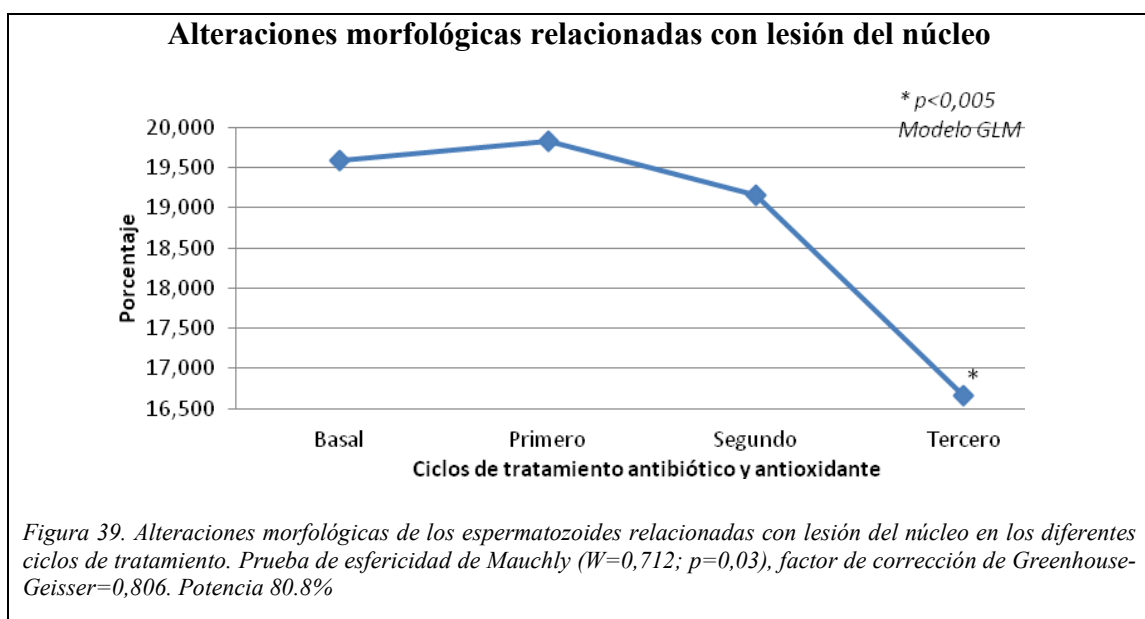


Figura 38. Morfología espermática. Defectos de la pieza principal del espermatozoide presentes en los pacientes infértiles y con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. A, B, C. Espermatozoides con flagelos enrollados, con bacterias adheridas y vacuolación del acrosoma. D. espermatozoides con defectos acrosomales y flagelos cortos.

De acuerdo a nuestros resultados, las anomalías morfológicas catalogadas como núcleos vacuolados, núcleos descondensados, núcleos sin acrosoma y amorfos, núcleos disminuidos y espermatozoides piriformes implican daños en la estructura nuclear. La comparación de estas alteraciones morfológicas entre el grupo de pacientes y el grupo control demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; *t-student*)

Se observó una disminución del porcentaje de células con lesiones nucleares en el grupo de pacientes conforme avanzó el tratamiento, se obtuvo una media de 19,59% para la muestra basal y de 16,66% para la muestra correspondiente al tercer ciclo de tratamiento. Los valores promedios de la morfología relacionada a lesiones nucleares se modifica significativamente a lo largo del tiempo ($p < 0,005$; *MLG*). (Figura 39) (Tabla XIII anexo)

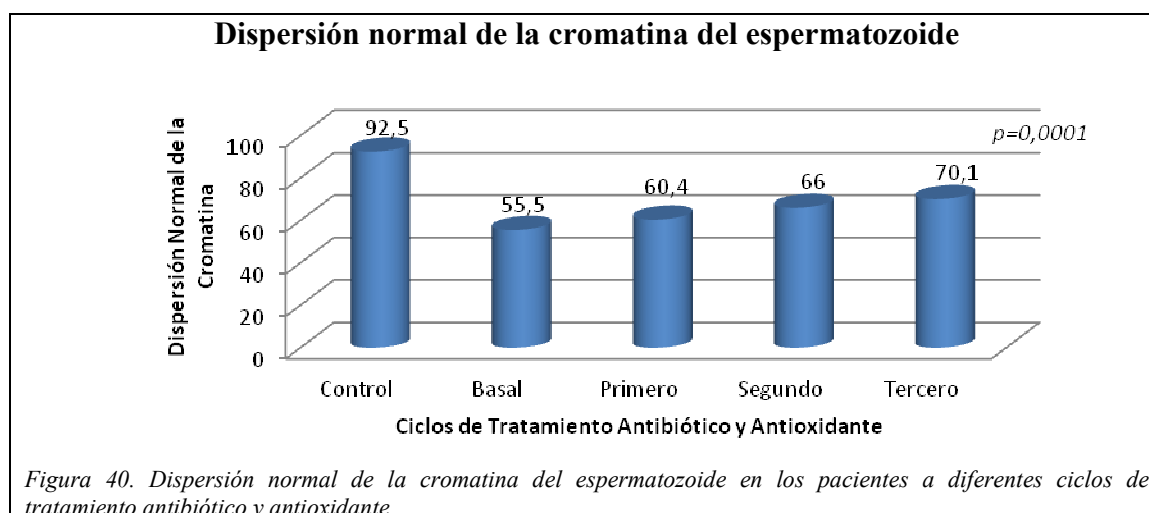


5.2.2.2 Dispersión normal de la cromatina

Los resultados de la técnica de dispersión de la cromatina aplicada a los espermatozoides de los pacientes y de los controles arrojó la siguiente información:

El grupo control presentó dispersión normal de la cromatina con un promedio de $92,48 \pm 3,65$, valores superiores a los obtenidos en el grupo de pacientes. En ellos el análisis basal de líquido seminal presentó una media de dispersión normal de la cromatina de $55,46 \pm 8,65$, el análisis de las células espermáticas después del primer ciclo de tratamiento reportó un promedio de $60,35 \pm 9,42$; después del segundo ciclo de tratamiento el promedio fue de $66,01 \pm 9,37$, y posterior al tercer ciclo de tratamiento se detectó dispersión normal de la cromatina espermática de $70,35 \pm 9,22$ en promedio.

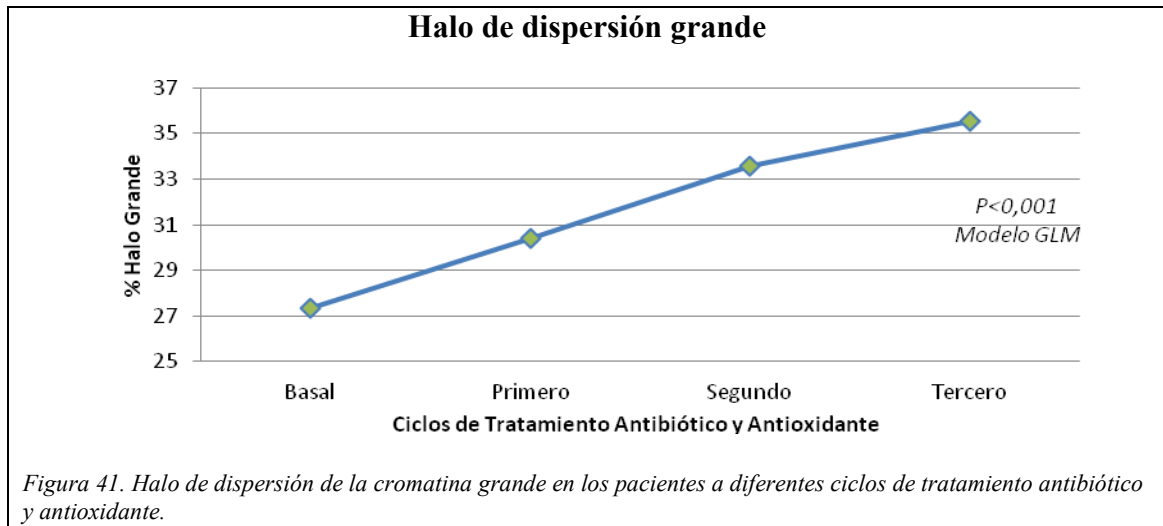
Cuando se compararon de manera individual los valores obtenidos en cada tiempo de la variable entre el grupo control con el grupo de pacientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p=0,02$). Para comparar si existían diferencias estadísticas en las cuatro ciclos de tratamiento se aplicó el test de Friedman, la media de los valores de dispersión normal de la cromatina en los diferentes ciclos de tratamiento, fueron significativas ($p=0,0001$). (Figura 40 y 47) (Tabla XI anexo)



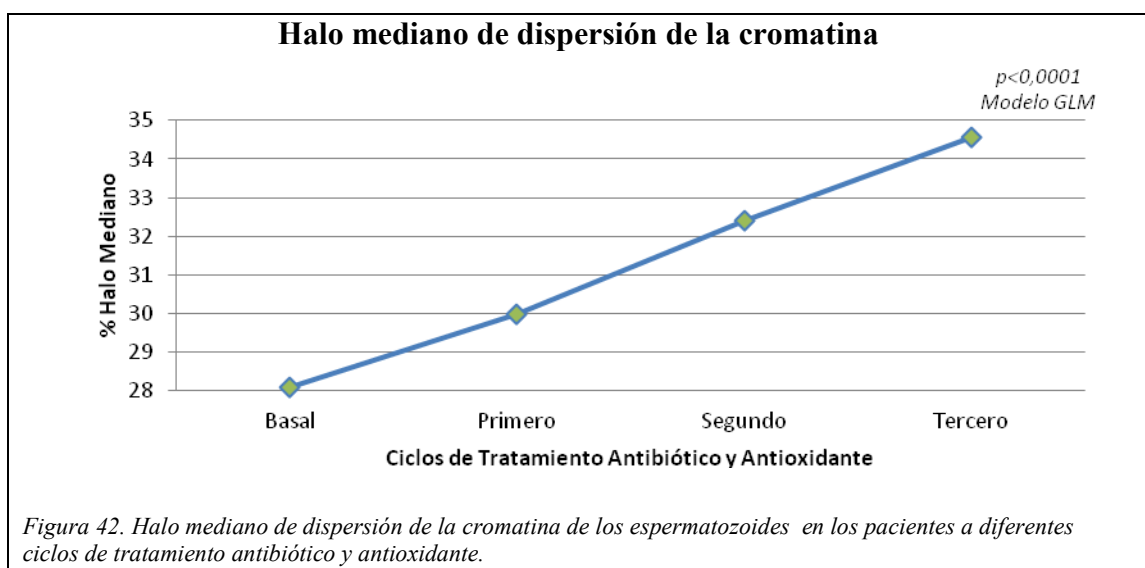
La dispersión normal de la cromatina del espermatozoide corresponde a la suma de los valores del halo de dispersión grande y el halo de dispersión mediano.

La media del halo de dispersión grande, para el grupo control fue de $74,38 \pm 7,12$, mientras que en el grupo de pacientes fue de $27,36 \pm 8,05$ en la muestra seminal basal, $30,39 \pm 9,27$ en la muestra post-primer tratamiento; $33,57 \pm 10,85$ en la evaluación después del segundo tratamiento y $35,53 \pm 9,43$ para el tercer ciclo de tratamiento. El test

estadístico U Man-Whitney aplicado a la comparación de la muestra basal con la del control, determinó que las diferencias de las medias fueron significativas ($p < 0,05$). De acuerdo al test de *Friedman*, la mejoría en los valores promedio de dispersión normal de la cromatina espermática, conforme se aplicaron los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante, fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,0001$). (Figura 41 y 47) (Tabla XI anexo)



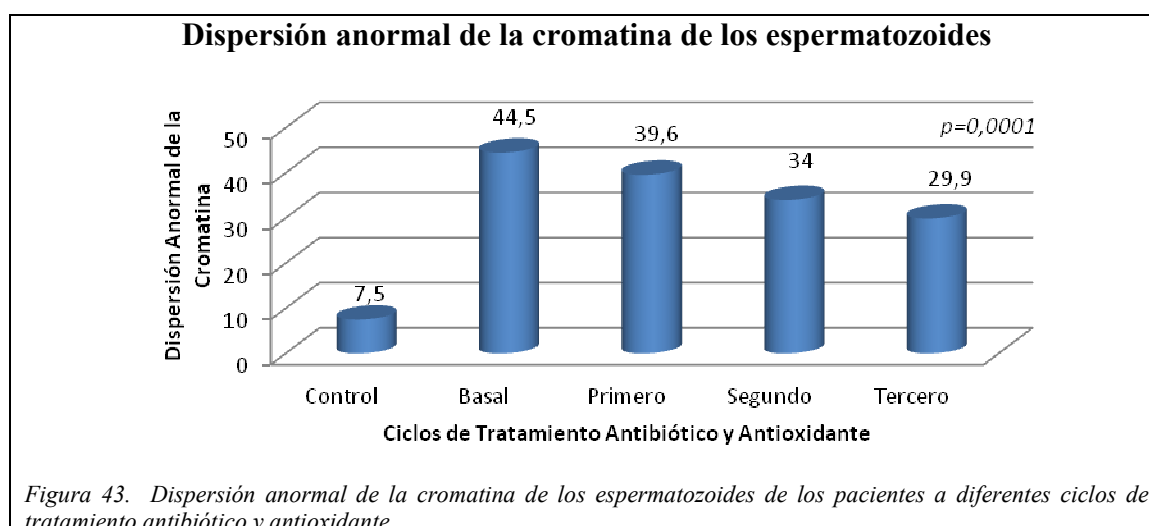
El análisis de los datos correspondientes a la variable de halo de dispersión mediano, considerado dentro de los parámetros de dispersión normal, no mostró diferencias significativas cuando se compararon de manera individual los valores con el control ($p > 0,05$). Para el análisis de esta variable con distribución normal se aplicó el modelo lineal general para medias repetidas (GLM), encontrando diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la evolución en el tiempo de esta variable ($p < 0,0001$). (Figura 42 y 47) (Tabla XI anexo)



5.2.2.3 Dispersión anormal de la cromatina

La prueba de dispersión de la cromatina de los espermatozoides aplicada a cada una de las muestras registró un patrón anormal de $7,52 \pm 3,65$, para el grupo control, mientras que en el grupo de pacientes fue de $44,54 \pm 8,6$ en la muestra seminal basal; $39,65 \pm 9,40$ en la muestra posterior al primer tratamiento antibiótico y antioxidante; $34,03 \pm 9,04$, después del segundo tratamiento y $29,65 \pm 9,2$ para el tercer ciclo de tratamiento.

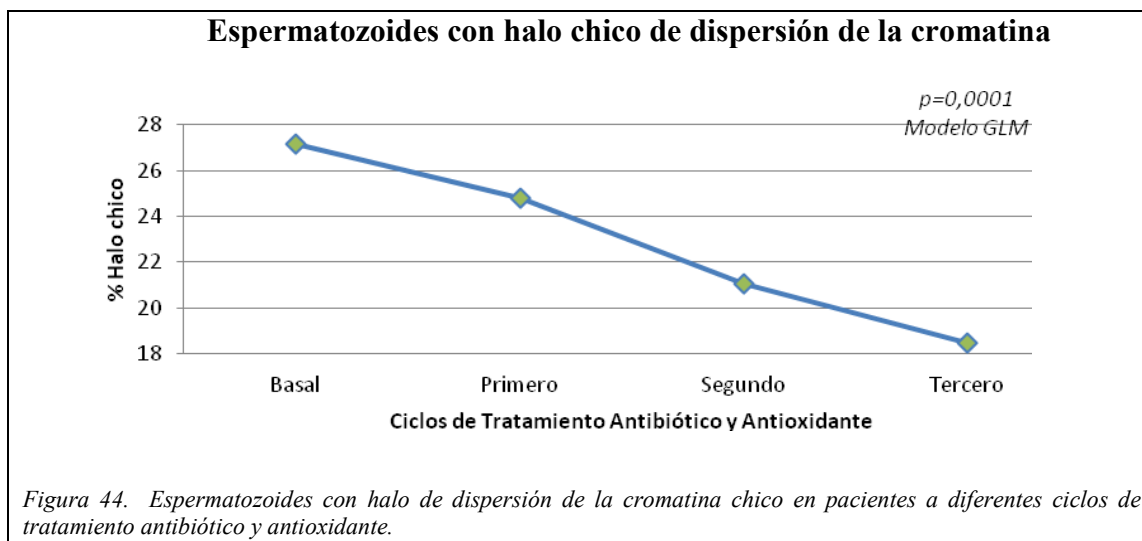
Al compararse cada una de éstas medias, de manera independiente frente al control, aplicando la U de Mann Whitney, se reportó un valor de $p=0,02$ en la muestra del segundo y tercer ciclo de tratamiento. Al comparar los valores promedio de las 4 muestras analizadas mediante el modelo de Friedman se reportó un valor de $p \leq 0,0001$ mostrando diferencias entre las muestras. (Figura 43 y 47) (Tabla XI anexo)



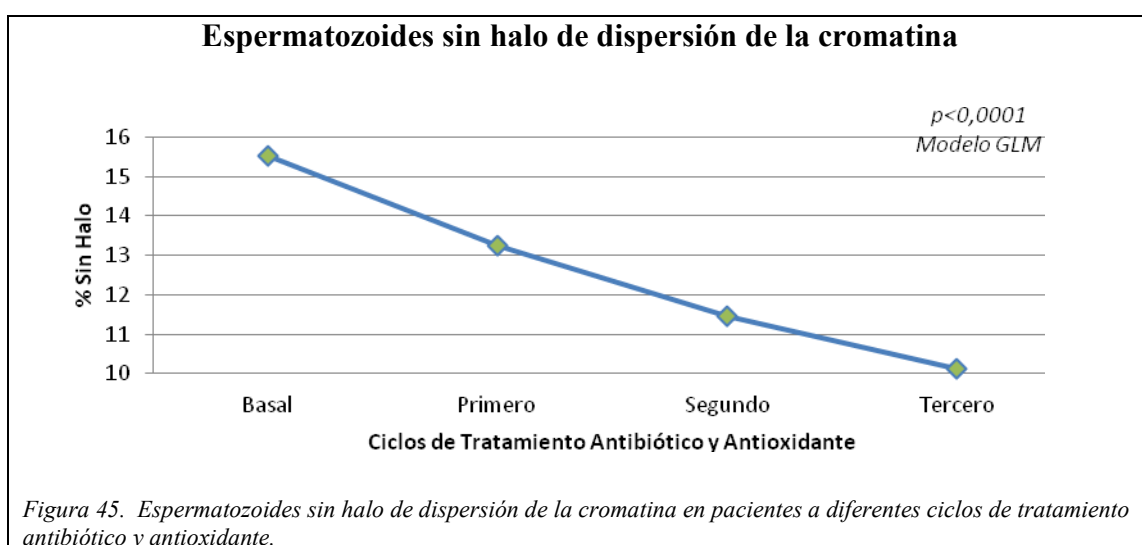
Como parte del patrón morfológico, de dispersión anormal de la cromatina del espermatozoide se encuentran el halo de dispersión chico, la ausencia de halo de dispersión y los espermatozoides con núcleo degradado.

Respecto a la presencia de espermatozoides con halo chico obtuvimos valores promedio en la muestra basal de $27,15 \pm 7,68$, después del primer ciclo de tratamiento de $24,80 \pm 7,45$, posterior al segundo ciclo de tratamiento: $21,06 \pm 6,68$ y $18,47 \pm 7,46$ en la lectura posterior al tercer ciclo de tratamiento. Cuando se compararon los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento del grupo de pacientes, con el grupo control ($6,42 \pm 3,40$) mediante la t-student se observó diferencia significativa solo en los valores posteriores al tercer ciclo de tratamiento ($p=0,01$). Al comparar este parámetro en las cuatro muestras mediante el modelo GLM los resultados mostraron la existencia

de variaciones significativas a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$). (Figura 44 y 47) (Tabla XI anexo)

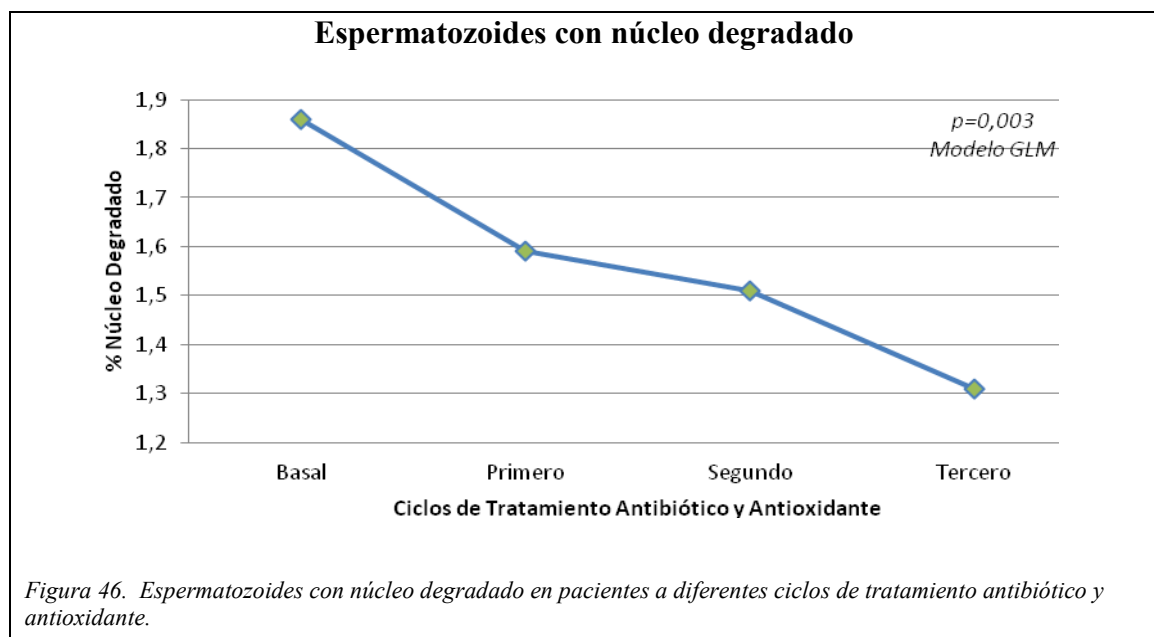


La ausencia de halo de dispersión de la cromatina espermática se observó con mayor frecuencia en el grupo de pacientes, principalmente en la muestra basal ($15,53 \pm 5,79$). El porcentaje de espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina fue disminuyendo a medida que se incrementó el número de ciclos de tratamiento, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa de éstos valores, cuando se realizó la comparación de las medias de las muestras de pacientes con las del grupo control ($p > 0,05$; *U de Mann Whitney*). Por otra parte cuando se compararon las medias de los diferentes grupos aplicando la prueba de Friedman, se confirmó que este parámetro sufrió modificaciones de significancia estadística a lo largo de los ciclos del tratamiento ($p \leq 0,0001$). (Figura 45 y 47) (Tabla XI anexo)



La presencia de núcleos degradados en la prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide fue de $0,11 \pm 0,27$ para el grupo control. El grupo de pacientes presento una media de $1,86 \pm 1,54$ para la muestra basal analizada, $1,59 \pm 1,36$ en el primer ciclo, $1,51 \pm 1,61$ el segundo ciclo y $1,31 \pm 1,20$ en el tercer ciclo de tratamiento.

Al comparar estos valores con el control no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$; *U de Mann Whitney*). Esta variable también presentó variaciones significativas a lo largo del tratamiento ($p < 0,003$; *Friedman*). (Figura 46 y 47) (Tabla XI anexo)



Morfología espermática. Defecto de la pieza principal del espermatozoide

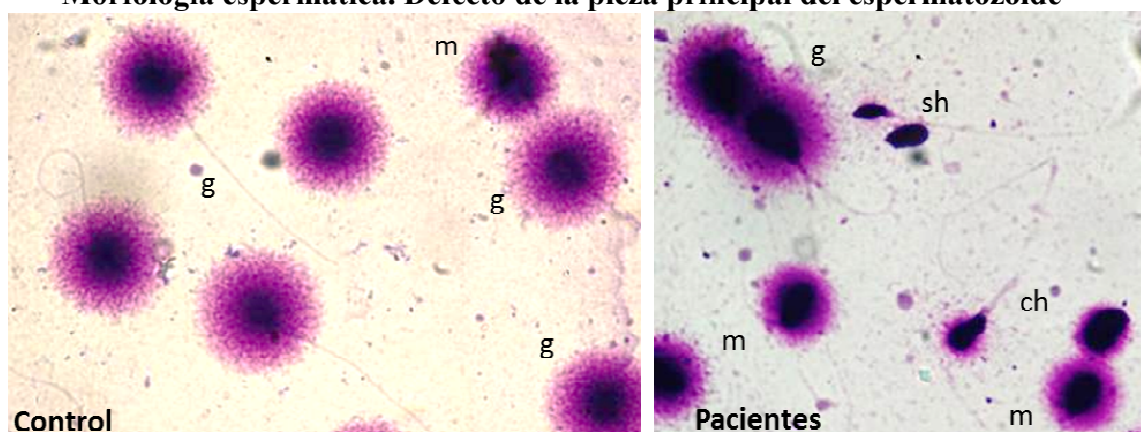


Figura 47. Dispersión de la cromatina de los espermatozoides. Control (Izquierda), espermatozoides con halos normales de dispersión de la cromatina (g= grande; m= mediano). Pacientes (derecha) espermatozoides con diferentes halos de dispersión de la cromatina g=grande; m= mediano; ch= chico y sh= sin halo. Tinción de Wright, 100x, Campo claro.

5.3 Comparación de variables modificadas por el tratamiento en función del embarazo

Tanto el primer y segundo ciclo de tratamiento se pudo aplicar en los 70 pacientes con una duración promedio de 7,03 semanas (3,29-9,14) para el primer ciclo y de 6,72 semanas (3,86-8,86) para el segundo ciclo. El último y tercer ciclo de tratamiento se administró a 56 pacientes durante 6,48 semanas (3,71-9,43). (Tabla XII)

| Semanas de tratamiento antibiótico y antioxidantes | | | |
|---|--------------|---------------|--------------|
| Ciclo de tratamiento | Primer Ciclo | Segundo Ciclo | Tercer Ciclo |
| Número de casos incluidos | 70 | 70 | 56 |
| Promedio | 7.02 | 6.72 | 6.48 |
| SD | 1.34 | 1.50 | 1.70 |
| Mínimo | 3.29 | 3.86 | 3.71 |
| Máximo | 9.14 | 8.86 | 9.43 |

Tabla XII. Tiempo de tratamiento antibiótico y antioxidante expresado en semanas y administrado a los pacientes en los tres ciclos asignados.

Para dar seguimiento a los objetivos de la tesis se consideraron dos grupos:

1. Pacientes masculinos cuyos cónyuges lograron el embarazo y nacimiento del producto sin complicaciones (Grupo embarazo)
2. Pacientes masculinos cuyos cónyuges no lograron procrear (Grupo no embarazo).

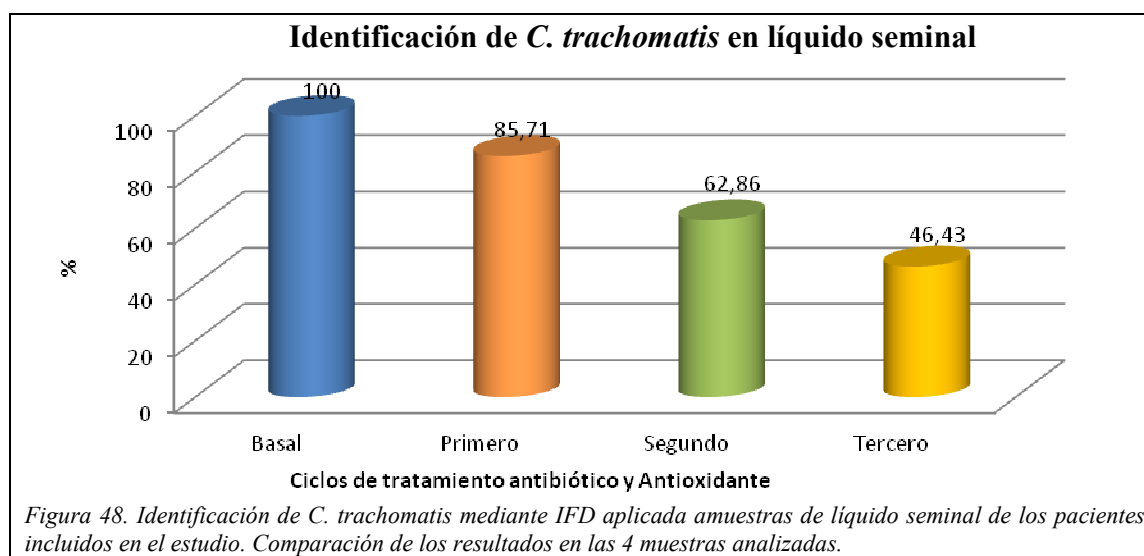
El análisis estadístico aplicado a los resultados de las pruebas de laboratorio descritas en la tesis se realizó solamente en función de estos dos grupos.

Para establecer si existen parámetros clínicos o de laboratorio con valor predictivo para el logro de embarazo sin complicaciones, se aplicó un análisis estadístico a variables que se consideró que pudieran ser importantes en ése sentido.

5.3.1 Diagnóstico microbiológico

Se buscó mediante Inmunofluorescencia directa la presencia de *C. trachomatis* en las muestras seminales de los pacientes obtenidas después de una semana de haber terminado cada uno de los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. De los 70 casos iniciales después del primer ciclo de tratamiento el resultado de la prueba fue de 60 muestras positivas para *C. trachomatis* (85.71%); después del segundo ciclo de tratamiento (n=70) dieron positivo a la prueba 44 pacientes (62.86%) y para el último ciclo de tratamiento de un total de 56 pacientes restantes, 26 (46,43%) aún dio positiva la prueba aplicada. Para este último ciclo de tratamiento algunos pacientes ya habían resuelto el problema de fertilidad, a estos, no se les practicaron pruebas microbiológicas

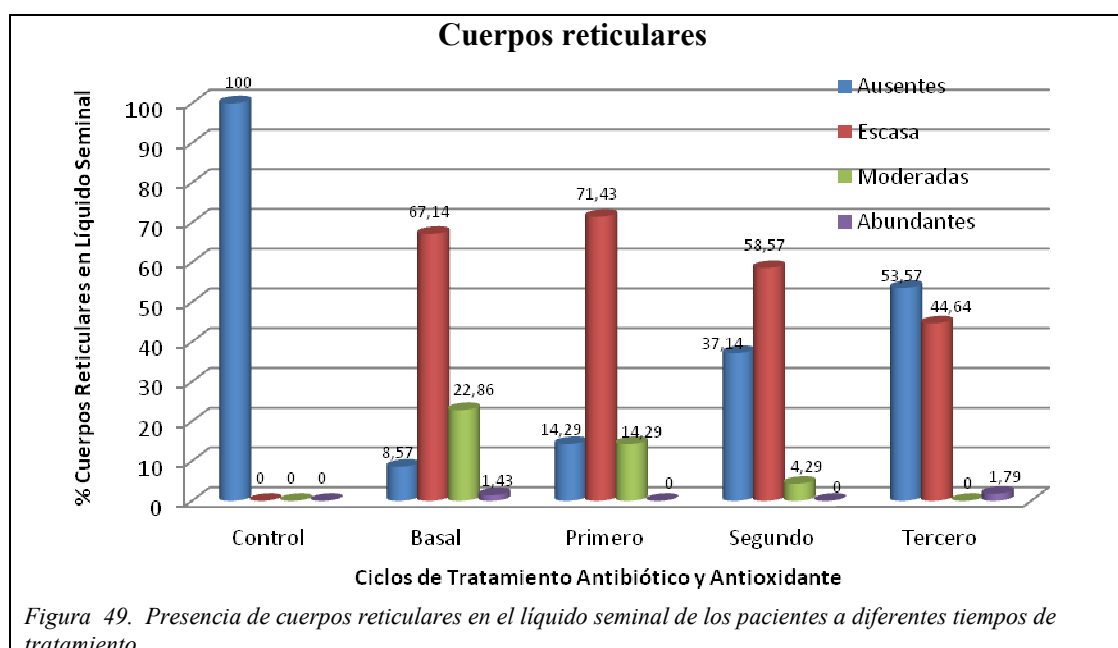
para evaluar el estado de la infección y el efecto del tratamiento administrado. (Figura 48)



La presencia de cuerpos reticulares de *C. trachomatis* presentes en el líquido seminal analizados mediante el examen citológico en fresco, fue menor en el grupo de pacientes que consiguieron embarazo. La diferencia fue significativa en el segundo ciclo de tratamiento, cuando se comparan ambos grupos ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). El número de cuerpos reticulares de *C. trachomatis* se redujo con los tratamientos y en un mayor número de pacientes su concentración fue referida como escasa. (Figura 49) (Tabla XIV-A)

| Cuerpos reticulares de <i>C. trachomatis</i> | | | | | |
|--|----------|----------|--------|-----------|------------|
| | | Ausentes | Escasa | Moderadas | Abundantes |
| Control n=28 | Recuento | 28 | 0 | 0 | 0 |
| | % | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Muestra Basal n=70 | Recuento | 6 | 47 | 16 | 1 |
| | % | 8,57 | 67,14 | 22,86 | 1,43 |
| Primer ciclo n=70 | Recuento | 10 | 50 | 10 | 0 |
| | % | 14,29 | 71,43 | 14,29 | 0,00 |
| Segundo ciclo n=70 | Recuento | 26 | 41 | 3 | 0 |
| | % | 37,14 | 58,57 | 4,29 | 0,00 |
| Tercer ciclo n=56 | Recuento | 30 | 25 | 0 | 1 |
| | % | 53,57 | 44,64 | 0,00 | 1,79 |

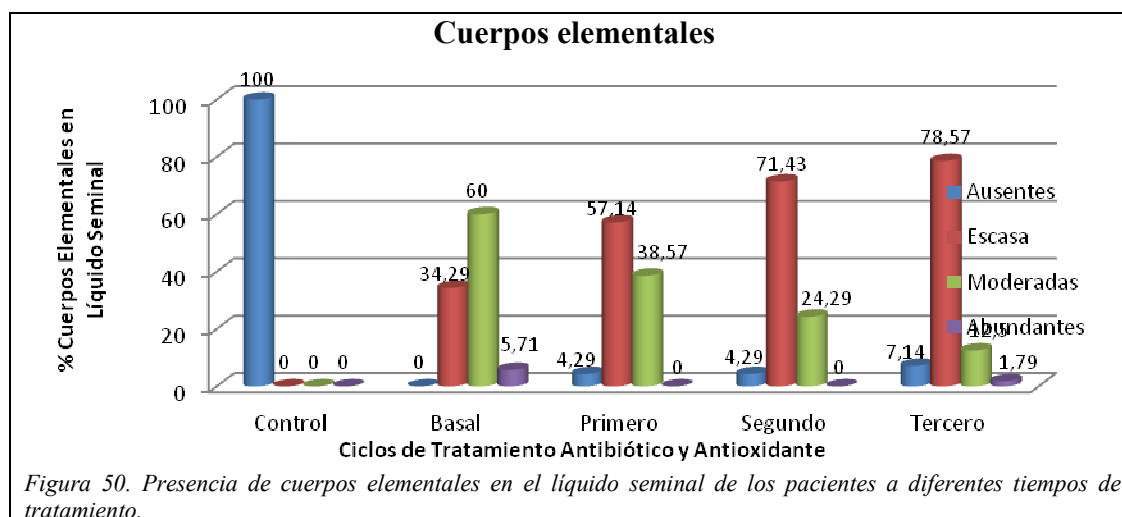
Tabla XIV-A. Concentración de cuerpos reticulares mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento



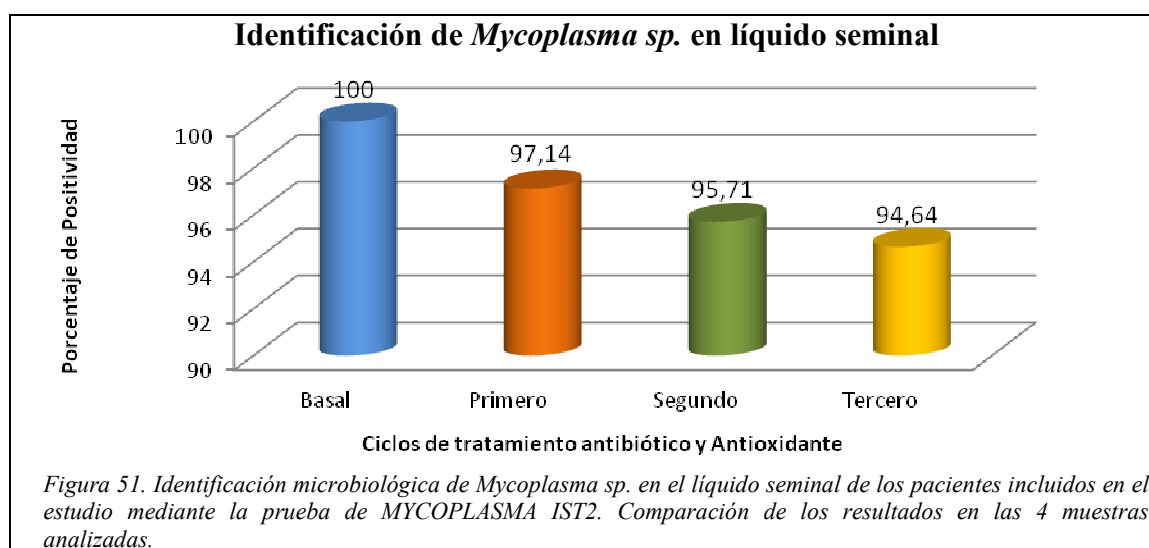
La presencia y concentración de cuerpos elementales de *Chlamydia* analizados mediante el examen citológico en fresco reportó una disminución de los cuerpos elementales para los dos grupos analizados. En el segundo ciclo de tratamiento de comprobó que la diferencia en el registro de concentración moderada de cuerpos elementales presentó una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). El resto de las mediciones de cuerpos elementales no sufrió cambios de significancia estadística. (Figura 50) (Tabla XIV-B)

| Cuerpos Elementales de <i>C. trachomatis</i> | | | | | |
|--|----------|----------|--------|-----------|------------|
| | | Ausentes | Escasa | Moderadas | Abundantes |
| Control n=28 | Recuento | 28 | 0 | 0 | 0 |
| | % | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Muestra Basal n=70 | Recuento | 0 | 24 | 42 | 4 |
| | % | 0,00 | 34,29 | 60,00 | 5,71 |
| Primer ciclo n=70 | Recuento | 3 | 40 | 27 | 0 |
| | % | 4,29 | 57,14 | 38,57 | 0,00 |
| Segundo ciclo n=70 | Recuento | 3 | 50 | 17 | 0 |
| | % | 4,29 | 71,43 | 24,29 | 0,00 |
| Tercer ciclo n=56 | Recuento | 4 | 44 | 7 | 1 |
| | % | 7,14 | 78,57 | 12,50 | 1,79 |

Tabla XIV-B. Concentración de cuerpos elementales mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento



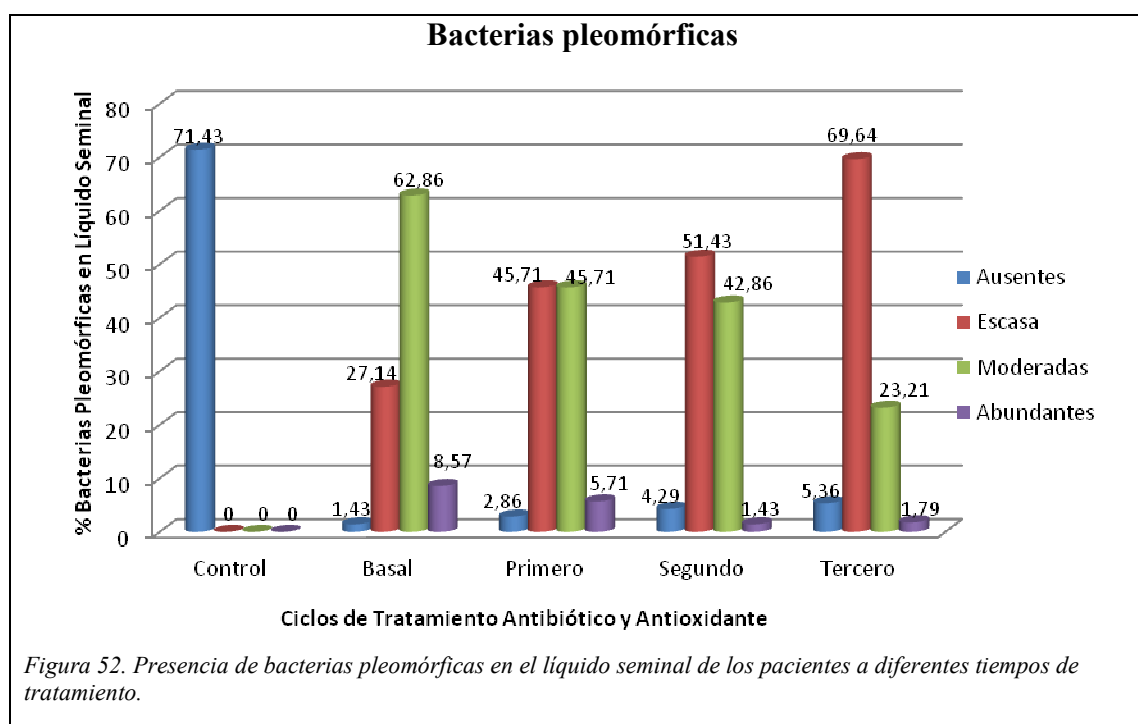
Al total de los pacientes incluidos en el estudio se les practicó cultivo microbiológico para la identificación de *Mycoplasma sp.* una vez terminado cada uno de los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante asignados, los resultados muestran que después de terminado el primer ciclo de tratamiento el número de casos en los que se identificó la bacteria fue de 68 (97,14%) de un total de 70 pacientes; para el segundo ciclo de tratamiento asignado al mismo número de pacientes, se aisló la bacteria en 67 casos (95,71%) y para el tercer ciclo de tratamiento los 56 pacientes restantes que siguieron con tratamiento 53 (94,64%) dieron positivo para *Mycoplasma sp.* Una vez terminado el tercer ciclo de tratamiento se observaron casos con embarazo, habiendo resuelto algunos pacientes el problema de fertilidad, a estos casos no se les practicaron pruebas microbiológicas para evaluar el estado de la infección y el efecto del tratamiento administrado. (Figura 51)



La concentración general de bacterias pleomórficas presentes en el líquido seminal realizada mediante el examen citológico en fresco fue persistentemente mayor en el grupo de pacientes sin embarazo respecto a los que reportaron embarazo. La estimación calculada como moderada de estas bacterias medidas a través de la técnica citológica en fresco, predominó en el grupo de pacientes sin embarazo, con una diferencia comprobada estadísticamente, contra el grupo de no embarazo. Ésta observación se registró solamente para el segundo ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). Para todas las muestras estudiadas, se observó una disminución de la concentración de bacterias en el líquido seminal durante el curso de los tratamientos. (Figura 52) (Tabla XV)

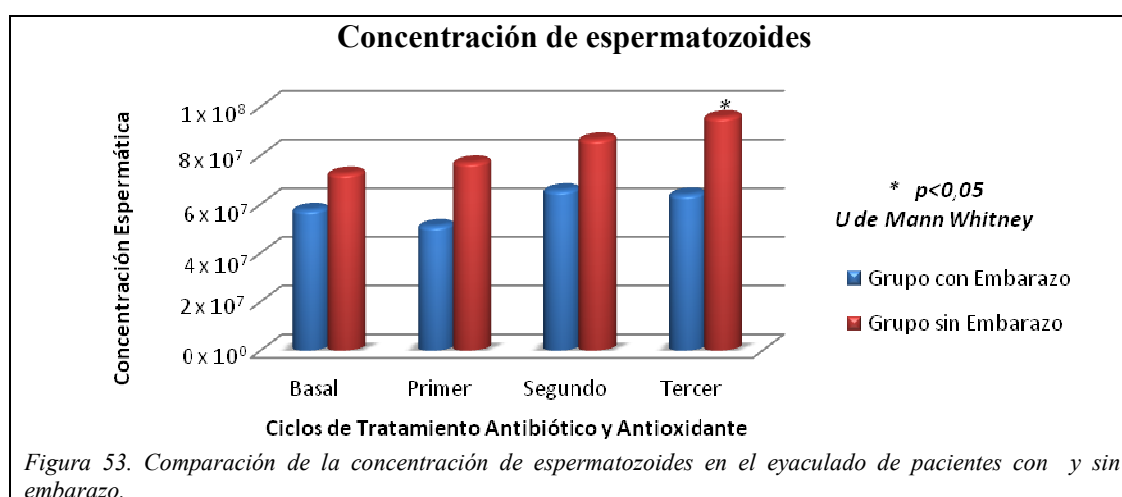
| Bacterias Pleomórficas | | | | | |
|------------------------|----------|----------|--------|-----------|------------|
| | | Ausentes | Escasa | Moderadas | Abundantes |
| Control n=28 | Recuento | 20 | 0 | 0 | 0 |
| | % | 71,43 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Muestra Basal n=70 | Recuento | 1 | 19 | 44 | 6 |
| | % | 1,43 | 27,14 | 62,86 | 8,57 |
| Primer ciclo n=70 | Recuento | 2 | 32 | 32 | 4 |
| | % | 2,86 | 45,71 | 45,71 | 5,71 |
| Segundo ciclo n=70 | Recuento | 3 | 36 | 30 | 1 |
| | % | 4,29 | 51,43 | 42,86 | 1,43 |
| Tercer ciclo n=56 | Recuento | 3 | 39 | 13 | 1 |
| | % | 5,36 | 69,64 | 23,21 | 1,79 |

Tabla XV. Concentración de Bacterias pleomórficas analizadas mediante el examen citológico en fresco en los pacientes sometidos a diferentes ciclos de tratamiento



5.3.2 Concentración de espermatozoides

Posterior al tratamiento antibiótico y desinflamatorio, la cifra de espermatozoides presentes en el líquido seminal fue comparativamente mayor en los pacientes que lograron embarazo. Sin embargo, solamente las diferencias en la concentración espermática medida después del tercer ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante fueron significativas estadísticamente ($p < 0,5$; *U de Mann Whitney*). (Figura 53) (Tabla XVI A y B anexo).



5.3.3 Motilidad espermática

De los cuatro niveles o grados considerados para la descripción del movimiento de los espermatozoides, solamente para el patrón de desplazamiento rectilíneo, después del primer ciclo de tratamiento, se observaron diferencias significativas en los valores promedio ($p = 0,028$; *U de Mann Whitney*). Para el resto de los patrones de movimiento de los espermatozoides, las diferencias entre los valores medios porcentuales, entre el grupo de pacientes cuyas cónyuges lograron embarazarse y los que no lo lograron, no fueron estadísticamente significativas.

Aún así, observamos que en el grupo de pacientes con embarazo positivo, la cifra de espermatozoides sin movimiento fue ligeramente inferior después del segundo y tercer ciclo de tratamiento, comparado con el grupo de pacientes que no lograron embarazo ($p = 0,474$).

En los pacientes con embarazo, el promedio de los porcentajes de espermatozoides con movimiento no progresivo *in situ* fue mayor en las primeras etapas del tratamiento que en el grupo de no embarazo, sin embargo, hacia el final del tratamiento estos valores se comportaron a la inversa ($p = 0,921$; *U de Mann Whitney*).

Los valores medios del movimiento espermático curvilíneo registradas fueron mayores para el grupo pacientes con embarazo, que en grupo de no embarazo, si bien estas diferencias no fueron significativas. Esto fue así para todas las mediciones, la de la muestra basal y las del primero, segundo y tercer ciclo de tratamiento.

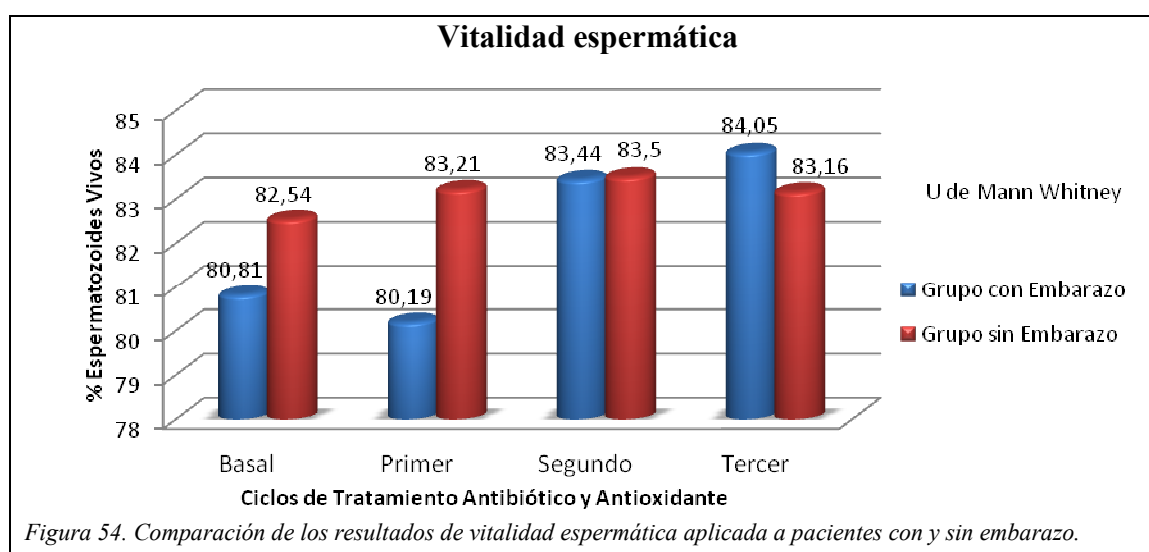
Con respecto al movimiento progresivo rectilíneo, el promedio de las lecturas basales y las posteriores al primer ciclo de tratamiento, fue mayor en el grupo de pacientes sin embarazo. En cambio después del segundo ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante, se observa una mejoría en éste parámetro en el grupo de pacientes con embarazon aunque como antes se refirió esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (Tabla XVII) (Tabla XVI A y B anexo). Los resultados calculados para cada una de estas variables se muestran en la tabla.

| Grupos Analizados | | Clasificación de la Motilidad espermática | | | |
|-------------------|-----------------------------|---|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Sin movimiento | Movimiento in situ | Movimiento curvilíneo | Movimiento rectilíneo |
| Muestra Basal | Embarazo (X) | 32,78 | 26,81 | 30,78 | 9,63 |
| | Embarazo (DS) | 13,63 | 9,19 | 9,18 | 7,41 |
| | No-Embarazo (X) | 30,25 | 26,71 | 29,39 | 13,64 |
| | No-Embarazo (DS) | 9,11 | 8,41 | 7,91 | 9,35 |
| | <i>U de Mann Whitney p=</i> | 0,332 | 0,820 | 0,409 | 0,092 |
| Primer ciclo | Grupo Embarazo (X) | 29,78 | 26,44 | 32,04 | 11,74 |
| | Grupo Embarazo (DS) | 12,11 | 9,98 | 9,25 | 7,36 |
| | Grupo No-Embarazo (X) | 27,93 | 25,14 | 31,07 | 15,86 |
| | Grupo No-Embarazo (DS) | 7,09 | 5,32 | 6,15 | 6,55 |
| | <i>U de Mann Whitney p=</i> | 0,661 | 0,846 | 0,643 | 0,028 |
| Segundo ciclo | Grupo Embarazo (X) | 26,04 | 24,26 | 33,85 | 15,85 |
| | Grupo Embarazo (DS) | 7,64 | 8,54 | 7,11 | 7,50 |
| | Grupo No-Embarazo (X) | 28,82 | 23,32 | 31,00 | 16,86 |
| | Grupo No-Embarazo (DS) | 9,84 | 6,75 | 7,60 | 7,76 |
| | <i>U de Mann Whitney p=</i> | 0,474 | 0,768 | 0,111 | 0,522 |
| Tercer ciclo | Grupo Embarazo (X) | 25,71 | 23,90 | 31,71 | 18,67 |
| | Grupo Embarazo (DS) | 7,77 | 6,92 | 7,88 | 4,54 |
| | Grupo No-Embarazo (X) | 28,80 | 24,36 | 30,96 | 15,88 |
| | Grupo No-Embarazo (DS) | 11,49 | 6,37 | 7,40 | 6,39 |
| | <i>U de Mann Whitney p=</i> | 0,487 | 0,921 | 0,611 | 0,139 |

Tabla XVII. Comparación de la motilidad espermática en función del embarazo. Pacientes del grupo con embarazo y sin embarazo.

5.3.4 Vitalidad espermática

El promedio de los porcentajes de espermatozoides vivos registrados en la muestra basal y en la del primer ciclo de tratamiento aplicado fue para el grupo de pacientes que no lograron embarazo mayor, que el del grupo cuyas cónyuges lograron el embarazo. El efecto del tratamiento antibiótico con respecto a éste parámetro es notorio en el grupo de pacientes que logran embarazo, ya que el promedio de los porcentajes se incrementa, pero en la comparación de estos valores con los del grupo de no embarazo, las diferencias analizadas mediante la U de Mann Whitney no muestra significancia estadística. (Figura 54) (Tabla XVI A y B anexo)



5.3.5 Parámetros citológicos asociados a inflamación

La presencia de *detritus celulares* en el líquido seminal no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con y sin embarazo. Se pudo observar una disminución en la concentración de éstos restos celulares para los dos grupos a medida del aumento de ciclos de tratamiento pero estas diferencias no son suficientes para considerarse significativas desde el punto de vista estadístico ($p=0,785$; *U Mann Whitney*). (Tabla XIX) (Tabla XVIII anexo)

Detritus celulares

| | Basal | | | | Primer ciclo | | | | Segundo ciclo | | | | Tercer ciclo | | | |
|-----------|-------|----|-----|------|--------------|------|-----|------|---------------|------|-----|------|--------------|------|-----|------|
| | C/E | | S/E | | C/E | | S/E | | C/E | | S/E | | C/E | | S/E | |
| | Rec | % | Rec | % | Rec | % | Rec | % | Rec | % | Rec | % | Rec | % | Rec | % |
| Ausentes | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3,7 | 1 | 3,6 | 2 | 7,4 | 3 | 10,7 | 0 | 0,0 | 3 | 12,0 |
| Escasas | 10 | 37 | 8 | 28,6 | 11 | 40,7 | 12 | 42,9 | 13 | 48,1 | 9 | 32,1 | 10 | 47,6 | 13 | 52,0 |
| Moderadas | 17 | 63 | 20 | 71,4 | 15 | 55,6 | 15 | 53,6 | 12 | 44,4 | 16 | 57,1 | 11 | 52,4 | 9 | 36,0 |

C/E: Con embarazo; S/E: Sin embarazo; Rec: Recuento

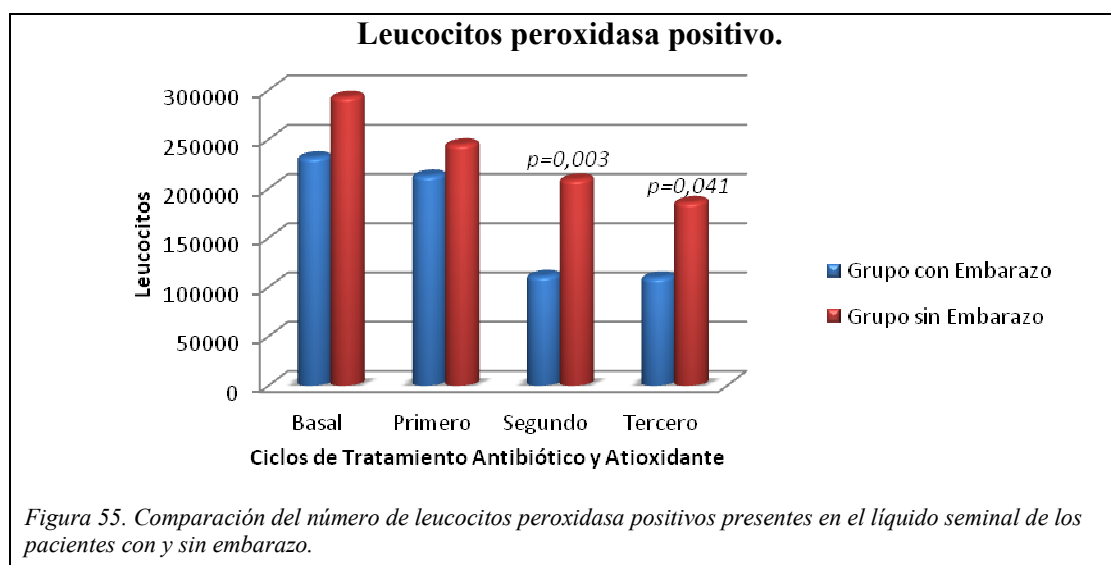
Tabla XIX. Efecto del tratamiento sobre la concentración de *detritus celulares* en función del embarazo.

La presencia de células redondas por campo microscópico se comparó entre el grupo de pacientes que lograron embarazo con los que no lo lograron, la estimación de células redondas presentes en el líquido seminal, muestra diferencias estadísticamente significativas solo para el segundo ciclo de tratamiento. Esta diferencia consistió en una disminución en el número de células presentes en el grupo de pacientes con embarazo ($p=0.023$; *U Mann Whitney*). El resto de las observaciones no muestra diferencias considerables (Tabla XVIII anexo)

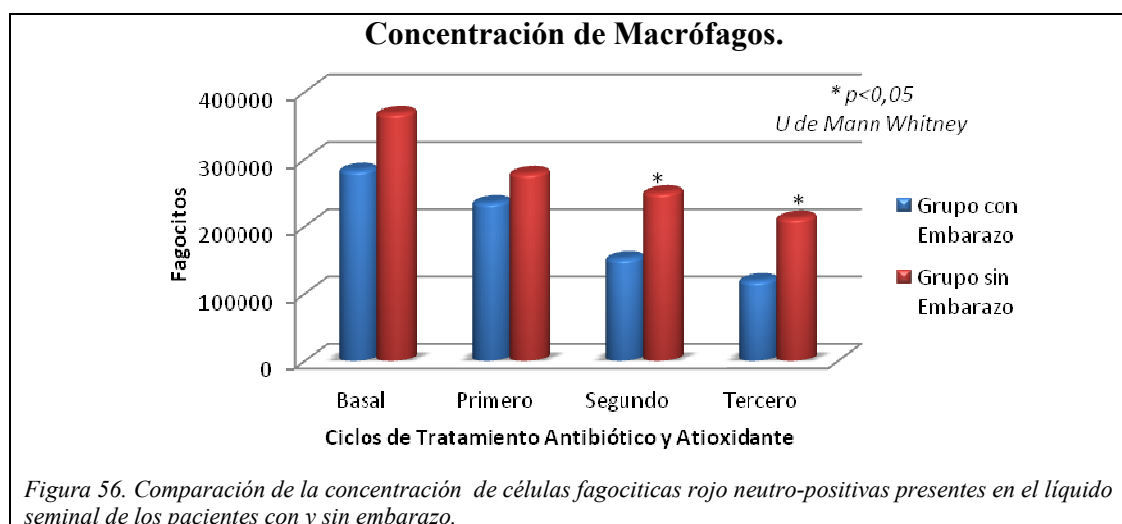
| CICLOS TRATAMIENTO | GRUPOS | CÉLULAS REDONDAS POR CAMPO MICROSCÓPICO X (DS) |
|---------------------------------|--------------------------|--|
| Análisis Basal del Semen | Con Embarazo (n=27) | 2,85 (1,56) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 2,93 (1,46) |
| Primer Ciclo | Embarazo Positivo (n=27) | 3,04 (2,01) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 2,86 (0,89) |
| Segundo Ciclo | Con Embarazo (n=27) | 2,22 (0,8) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 3,11 (1,52) |
| Tercer ciclo | Con Embarazo (n=21) | 2,90 (1,92) |
| | Sin Embarazo (N=25) | 2,80 (2,06) |

Tabla XX. Efecto del tratamiento sobre la concentración de células redondas presentes en el líquido seminal de los pacientes en función del embarazo.

Las comparaciones realizadas en la concentración de leucocitos de las muestras seminales de pacientes que lograron el embarazo y los que no lo lograron, muestra diferencias estadísticamente significativas para el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p<0,05$; *U Mann Whitney*), pero en general se observó disminución en el número de leucocitos presentes en el líquido seminal de los pacientes de los dos grupos analizados. (Figura 55) (Tabla XXI Anexo)



La concentración de macrófagos demostradas por la tinción de rojo neutro, presentes en el líquido seminal fue mayor en el grupo de pacientes sin embarazo. Esta diferencia se presentó en todas las muestras analizadas, pero solo fueron estadísticamente significativas las correspondientes al segundo y tercer ciclo de tratamiento administrado ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). (Figura 56) (Tabla XXI Anexo)



La concentración de células epiteliales presentes en el líquido seminal se calificó predominantemente como escasa en el total de las muestras analizadas de los pacientes con y sin embarazo. En general se observó que el número de células epiteliales exfoliadas de la vía seminífera, disminuyó con el tratamiento en ambos grupos de pacientes. Sin embargo el análisis de comparación entre grupos no arrojó diferencias estadísticamente comprobadas. (Tabla XXII)

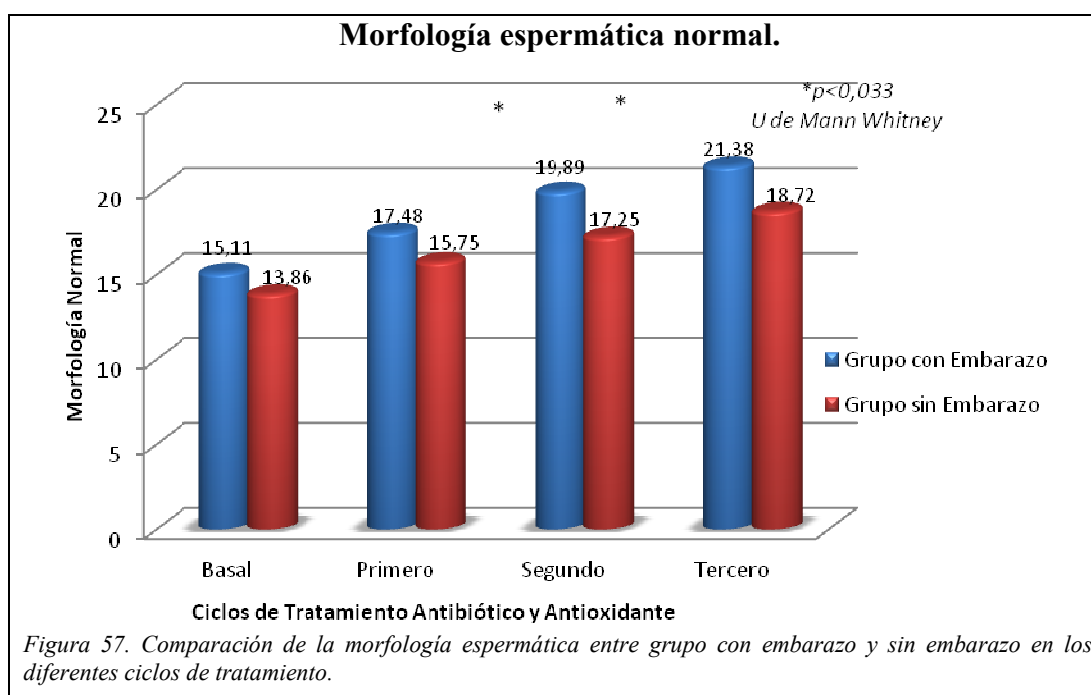
| CICLOS TRATAMIENTO | GRUPOS | Presencia de Células epiteliales | | | |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|------------|
| | | Ausentes | Escasas | Moderadas | Abundantes |
| Análisis Basal del Semen | Con Embarazo (n=27) | 5 (18,5 %) | 14 (51,9 %) | 7 (25,9 %) | 1 (3,7 %) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 3 (10,7 %) | 12 (42,9 %) | 13 (46,4 %) | 0 (0 %) |
| Primer Ciclo | Embarazo Positivo (n=27) | 5 (18,5 %) | 16 (59,3 %) | 6 (22,2 %) | 0 (0 %) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 2 (7,1 %) | 22 (78,6 %) | 4 (14,3 %) | 0 (0 %) |
| Segundo Ciclo | Con Embarazo (n=27) | 5 (18,5 %) | 21 (77,8 %) | 1 (3,7 %) | 0 (0 %) |
| | Sin Embarazo (n=28) | 3 (10,7 %) | 23 (82,1 %) | 2 (7,1 %) | 0 (0 %) |
| Tercer ciclo | Con Embarazo (n=21) | 4 (19 %) | 17 (80,9 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| | Sin Embarazo (N=25) | 5 (20 %) | 20 (80 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

Tabla XXII. Presencia de células epiteliales en pacientes con y sin embarazo a diferentes tiempos de tratamiento

5.3.6 Morfología Espermática

El promedio de espermatozoides con morfología normal para los dos grupos estudiados, presentó aumento de los valores a medida que se incrementó el número de ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

Cuando se compararon los valores en los dos grupos estudiados se observó que esta diferencia fue estadísticamente significativa para el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$: *U de Mann Whitney*). (Figura 57) (Tabla XVI-A y B anexo)



Entre los diferentes tipos de defectos de la morfología de la cabeza del espermatozoide vistos en pacientes con y sin embarazo muestran diferencias estadísticamente significativas solamente para los espermatozoides descritos como piriformes, en la evaluación correspondientes al segundo ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). Los restantes tipos de alteraciones de la forma de la cabeza de los espermatozoides considerados en este análisis no presentan diferencias estadísticas, cuando se compararon los resultados del grupo que logró embarazo con los del grupo que no lo logró.

Adicionalmente observamos que la presencia de espermatozoides microcéfalos en los dos grupos analizados, muestra un ligero incremento en sus valores a través del tiempo, mientras que el número de espermatozoides piriformes se reduce con el tiempo. Los espermatozoides calificados como macrocéfalos, bicéfalos y piriformes no sufren

modificaciones en los diferentes ciclos de tratamiento. (Tabla XXIII-A) (Tabla XXIII-B Anexo)

| | | | MACROCEFALO | MICROCEFALO | BICEFALO | CABEZA PIRIFORME | CABEZA DE ALFILER |
|---------------|----------------------|----|-------------|-------------|----------|---------------------|-------------------------|
| Muestra Basal | Con Embarazo n=27 | X | 0,19 | 0,3 | 0,44 | 4,67 | 0,33 |
| | | DS | 0,56 | 0,67 | 1,15 | 3,48 | 1,27 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 0,18 | 0,5 | 0,25 | 5,32 | 0,39 |
| | | DS | 0,77 | 1,07 | 0,65 | 3,44 | 1,55 |
| | | p | 0,624 | 0,673 | 0,847 | 0,473 | 0,698 |
| Primer ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 0,78 | 0,44 | 0,22 | 4,22 | 0,22 |
| | | DS | 1,69 | 0,8 | 0,7 | 4,18 | 1,15 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 0,39 | 0,86 | 0,07 | 5,11 | 0,18 |
| | | DS | 0,92 | 1,63 | 0,26 | 3,93 | 0,55 |
| | | p | 0,41 | 0,55 | 0,57 | 0,33 | 0,35 |
| Segundo ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 0,44 | 0,7 | 0,37 | 4,22 | 0,33 |
| | | DS | 0,85 | 1,03 | 0,79 | 3,42 | 0,73 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 0,89 | 0,96 | 0,57 | 6,04 | 0,43 |
| | | DS | 1,42 | 1,29 | 1,35 | 3,08 | 0,96 |
| | | p | 0,23 | 0,53 | 0,93 | 0,02 | 0,95 |
| Tercer ciclo | Con Embarazo n=21 | X | 1,86 | 1,52 | 0,95 | 4 | 0,33 |
| | | DS | 1,71 | 1,29 | 1,32 | 2,17 | 0,66 |
| | Sin Embarazo n=25 | X | 1,96 | 1,44 | 0,68 | 4,4 | 0,48 |
| | | DS | 1,4 | 1,36 | 1,18 | 2,75 | 0,96 |
| | | p | 0,68 | 0,74 | 0,35 | 0,71 | 0,72 |

Tabla XXIII-A. Alteraciones de la cabeza de los espermatozoides en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias.

Respecto a las alteraciones de la morfología del núcleo, la presencia de espermatozoides segmentados en las muestras del segundo y tercer ciclo de tratamiento fue menor en el grupo de pacientes con embarazo y se redujo significativamente con el tiempo ($p<0,05$; *U de Mann Whitney*). Los espermatozoides binucleados se incrementaron con el tiempo en el grupo de pacientes sin embarazo y este incremento fue estadísticamente significativo para el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p<0,05$; *U de Mann Whitney*).

En las variantes de espermatozoides con núcleo descondensado y núcleo vacuolado, se observó una disminución conforme se dieron los tratamientos, observándose una diferencia en los porcentajes presentes en el grupo con embarazo comparativamente con las cifras que se observaron en el grupo sin embarazo. La presencia de espermatozoides con núcleo elongado fue menor para el grupo de

pacientes con embarazo pero la diferencia con el grupo de no embarazo no fue significativa. (Tabla XXIV-A) (Tabla XXIV-B y C Anexo)

| Alteraciones morfológicas del Núcleo | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|----|-------------------|-----------------|-------------|----------------|-------------------|----------------------|------------------|
| | | | Núcleo Disminuido | Núcleo Elongado | Bi-nucleado | Multi-nucleado | Núcleo segmentado | Núcleo descondensado | Núcleo vacuolado |
| Muestra Basal | Con Embarazo n=27 | X | 196 | 2,89 | 0,07 | 0,19 | 0,33 | 4,22 | 6,74 |
| | | DS | 2,59 | 2,49 | 0,27 | 0,56 | 1,21 | 3,65 | 4,10 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 1,75 | 3,68 | 0,14 | 0,00 | 0,64 | 3,46 | 8,36 |
| | | DS | 2,15 | 2,91 | 0,45 | 0,00 | 2,26 | 2,80 | 4,18 |
| Primer ciclo | Con Embarazo n=27 | p | 0,942 | 0,375 | 0,648 | 0,072 | 0,988 | 0,538 | 0,252 |
| | | X | 1,67 | 3,30 | 0,15 | 0,04 | 0,15 | 4,26 | 8,00 |
| | Sin Embarazo n=28 | DS | 2,66 | 3,27 | 0,77 | 0,19 | 0,53 | 4,70 | 3,66 |
| | | X | 2,39 | 3,75 | 0,07 | 0,00 | 0,61 | 3,68 | 8,29 |
| Segundo ciclo | Con Embarazo n=27 | DS | 2,67 | 2,90 | 0,26 | 0,00 | 1,83 | 2,70 | 3,20 |
| | | p | 0,235 | 0,515 | 0,608 | 0,309 | 0,263 | 0,725 | 0,81 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 3,52 | 2,78 | 0,04 | 0,07 | 0,07 | 2,63 | 5,85 |
| | | DS | 4,63 | 3,42 | 0,19 | 0,38 | 0,38 | 2,40 | 2,85 |
| Tercer ciclo | Con Embarazo n=21 | X | 3,32 | 3,39 | 0,39 | 0,32 | 0,71 | 3,18 | 6,11 |
| | | DS | 3,82 | 2,96 | 0,74 | 0,72 | 1,80 | 2,37 | 2,88 |
| | Sin Embarazo n=25 | p | 0,823 | 0,364 | 0,023 | 0,099 | 0,027 | 0,345 | 0,752 |
| | | X | 2,00 | 2,43 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | 3,38 | 5,10 |
| | Con Embarazo n=21 | DS | 3,10 | 2,77 | 0,44 | 0,30 | 0,22 | 2,82 | 2,07 |
| | | X | 1,96 | 3,36 | 0,84 | 0,52 | 0,72 | 2,92 | 4,64 |
| | Sin Embarazo n=25 | DS | 1,81 | 2,51 | 1,18 | 0,96 | 1,28 | 2,33 | 1,82 |
| | | p | 0,539 | 0,159 | 0,006 | 0,094 | 0,018 | 0,973 | 0,636 |

Tabla XXIV-A. Alteraciones del núcleo del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias.

En el análisis de las alteraciones morfológicas del acrosoma, la presencia de vacuolas intra acrosomales reportadas fue una característica observada con frecuencia en los pacientes con embarazo negativo; cuando se compararon las medias de este grupo y el grupo de pacientes con embarazo, se observaron diferencias estadísticamente significativas para las muestra basales y las del primer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*).

Otra alteración morfológica que mostró diferencia estadística significativa fue la presencia de acrosoma con área menor de 20% del normal. Éste carácter morfológico fue más frecuente en el grupo de pacientes con embarazo y a medida que aumentó el número de ciclos de tratamiento disminuyeron los porcentajes alcanzando cifras cercanas a la de los pacientes que no reportaron embarazo. El análisis estadístico

aplicado a la comparación entre grupos evidenció diferencias significativas para la muestra basal y la del primer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*).

En general en todas las mediciones, conforme avanzó el tratamiento antibiótico y antioxidante, se apreció una elevación en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma mayor de 70%, tanto en grupo de embarazo como en el de no embarazo. Las diferencias en las medias de esos porcentajes no fueron significativas para ninguno de los ciclos. El resto de las variables de la morfología acrosomal, no mostró diferencias de importancia. (Tabla XXV-A) (XXV-B y C)

| Alteraciones morfológicas del acrosoma | | | | | | | | |
|--|-------------------|----|------------------------|--------------------|------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| | | | Acrosoma mayor de >70% | Acrosoma de 20-39% | Acrosoma menor de <20% | Sin Acrosoma Amorfo | Sin acrosoma redondo | Acrosoma vacuolado |
| Muestra Basal | Con Embarazo n=27 | X | 0,93 | 1,41 | 6,74 | 1,63 | 2,81 | 3,00 |
| | | DS | 1,64 | 2,04 | 5,23 | 2,22 | 3,00 | 3,63 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 1,00 | 1,64 | 3,64 | 2,18 | 2,31 | 4,89 |
| | | DS | 1,59 | 2,72 | 3,48 | 2,51 | 2,52 | 3,88 |
| | | p | 0,738 | 0,804 | 0,027 | 0,336 | 0,617 | 0,035 |
| Primer ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 0,59 | 1,74 | 6,85 | 1,44 | 2,26 | 2,85 |
| | | DS | 1,12 | 2,30 | 5,44 | 1,78 | 2,68 | 2,61 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 1,36 | 0,82 | 3,21 | 1,43 | 2,68 | 5,79 |
| | | DS | 2,23 | 1,66 | 2,91 | 2,32 | 2,2 | 2,91 |
| | | p | 0,191 | 0,063 | 0,007 | 0,578 | 0,303 | 0,000 |
| Segundo ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 2,37 | 1,70 | 6,00 | 1,89 | 2,63 | 4,41 |
| | | DS | 4,19 | 2,09 | 3,95 | 1,99 | 2,13 | 3,43 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 1,96 | 2,39 | 3,57 | 2,46 | 2,64 | 4,25 |
| | | DS | 2,25 | 2,66 | 2,74 | 2,49 | 2,42 | 1,96 |
| | | p | 0,705 | 0,314 | 0,025 | 0,478 | 0,918 | 0,858 |
| Tercer ciclo | Con Embarazo n=21 | X | 2,95 | 2,24 | 5,43 | 2,48 | 2,48 | 5,05 |
| | | DS | 2,84 | 1,84 | 3,85 | 1,57 | 1,89 | 3,50 |
| | Sin Embarazo n=25 | X | 2,16 | 2,04 | 5,04 | 2,28 | 2,68 | 4,72 |
| | | DS | 2,27 | 2,17 | 3,71 | 1,67 | 2,08 | 2,37 |
| | | p | 0,386 | 0,55 | 0,748 | 0,677 | 0,883 | 1,00 |

Tabla XXV-A. Alteraciones del acrosoma del espermatozoide en función del embarazo a diferente tiempo de tratamiento. Comparación de medias.

Los espermatozoides con alteraciones de la pieza media fueron frecuentemente observados en los pacientes con y sin embarazo. Este parámetro se reduce en los dos grupos a medida que los ciclos de tratamiento aumentan, para comprobar que estas diferencias fueran estadísticamente significativas ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*) para la muestra basal, primer y segundo ciclo de tratamiento. No se observaron cambios significativos para el tercer ciclo.

La presencia de pieza media engrosada no muestra variaciones entre los dos grupos y solamente se reduce con el tiempo. En el caso del incremento de la gota de citoplasma residual no se observan cambios en ninguno de los grupos analizados. (Tabla XXVI-A) (Tabla XXVI-B anexo)

| Alteraciones de la pieza media | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|----|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | Pieza media engrosada | Pieza media doblada | Citoplasma residual |
| Muestra Basal | Con Embarazo n=27 | X | 14,52 | 11,26 | 6,67 |
| | | DS | 6,02 | 5,62 | 3,77 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 14,96 | 7,96 | 7,50 |
| | | DS | 4,59 | 4,92 | 3,33 |
| | | | 0,419 | 0,022 | 0,426 |
| | | | <i>p</i> | | |
| Primer ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 16,00 | 12,41 | 6,41 |
| | | DS | 5,40 | 5,04 | 3,69 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 14,57 | 7,86 | 7,71 |
| | | DS | 4,68 | 3,70 | 3,99 |
| | | | 0,635 | 0 | 0,404 |
| | | | <i>p</i> | | |
| Segundo ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 13,70 | 11,37 | 7,00 |
| | | DS | 5,51 | 5,02 | 3,50 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 12,96 | 7,82 | 6,50 |
| | | DS | 4,65 | 5,23 | 3,11 |
| | | | 0,779 | 0,008 | 0,633 |
| | | | <i>p</i> | | |
| Tercer ciclo | Con Embarazo n=21 | X | 12,95 | 9,52 | 6,33 |
| | | DS | 5,65 | 4,58 | 2,82 |
| | Sin Embarazo n=25 | X | 11,76 | 7,88 | 6,16 |
| | | DS | 3,88 | 4,06 | 2,85 |
| | | | 0,588 | 0,153 | 0,623 |
| | | | <i>p</i> | | |

Tabla XXVI-A. Alteraciones de la pieza media del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias.

En el análisis de las alteraciones de la pieza principal del flagelo, al comparar las medias de los dos grupos estudiados se observaron diferencias estadísticas para la variable presencia de flagelos enrollados, aunque esta diferencia solo fue válida para la muestra basal analizada, ($p=0,029$; *U de Mann Whitney*). Para el resto de los ciclos se observó disminución de las medias reportadas, pero no fueron estadísticamente significativas.

La presencia de flagelos cortos en los espermatozoides presentó diferencia significativa en las muestras del segundo ciclo de tratamiento cuando se compararon pacientes con y sin embarazo ($p=0,027$; *U de Mann Whitney*). Sin embargo, aún sin haber diferencias significativas entre grupos, se observó consistentemente, un incremento de las medias de este parámetro con el tiempo.

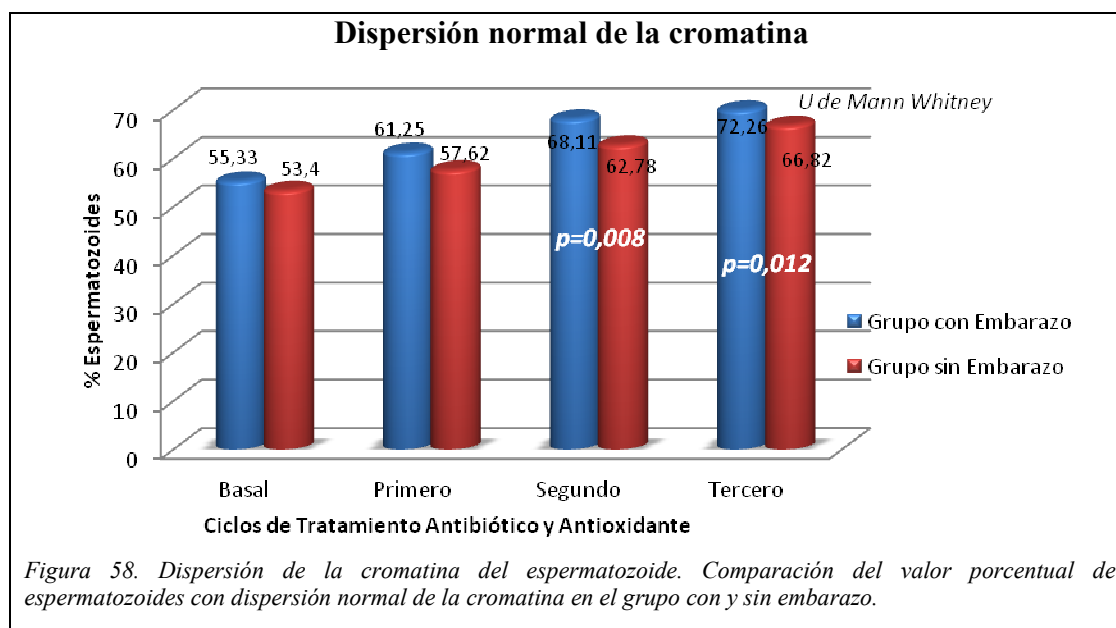
Los porcentajes de flagelos dobles y gruesos reportados no mostraron variaciones estadísticamente significativas. (Tabla XXVII-A) (Tabla XXVII-B Anexo)

| Alteraciones de la pieza principal del flagelo | | | | | | |
|--|----------------------|----------|-------------------|---------------|----------------|---------------|
| | | | Flagelo enrollado | Flagelo Corto | Flagelo Grueso | Flagelo Doble |
| Muestra Basal | Con Embarazo n=27 | X | 11,59 | 3,85 | 12,33 | 0,78 |
| | | DS | 4,48 | 2,97 | 6,66 | 1,25 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 9,46 | 4,25 | 13,96 | 1,04 |
| | | DS | 6,89 | 2,66 | 5,52 | 2,73 |
| | | <i>p</i> | 0,029 | 0,514 | 0,223 | 0,788 |
| Primer ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 11,30 | 3,26 | 10,67 | 0,63 |
| | | DS | 8,57 | 2,88 | 7,32 | 1,15 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 10,86 | 4,57 | 12,57 | 0,36 |
| | | DS | 5,58 | 1,99 | 4,65 | 1,06 |
| | | <i>p</i> | 0,872 | 0,027 | 0,388 | 0,267 |
| Segundo ciclo | Con Embarazo n=27 | X | 10,11 | 4,04 | 11,63 | 1,33 |
| | | DS | 4,97 | 2,53 | 5,75 | 1,80 |
| | Sin Embarazo n=28 | X | 9,11 | 4,32 | 13,39 | 1,11 |
| | | DS | 5,81 | 2,37 | 5,22 | 2,01 |
| | | <i>p</i> | 0,402 | 0,465 | 0,22 | 0,609 |
| Tercer ciclo | Con Embarazo n=21 | X | 9,76 | 4,38 | 11,05 | 2,14 |
| | | DS | 5,20 | 2,11 | 5,32 | 1,88 |
| | Sin Embarazo n=25 | X | 9,52 | 4,96 | 12,92 | 2,32 |
| | | DS | 5,18 | 1,72 | 4,56 | 1,93 |
| | | <i>p</i> | 0,921 | 0,544 | 0,224 | 0,727 |

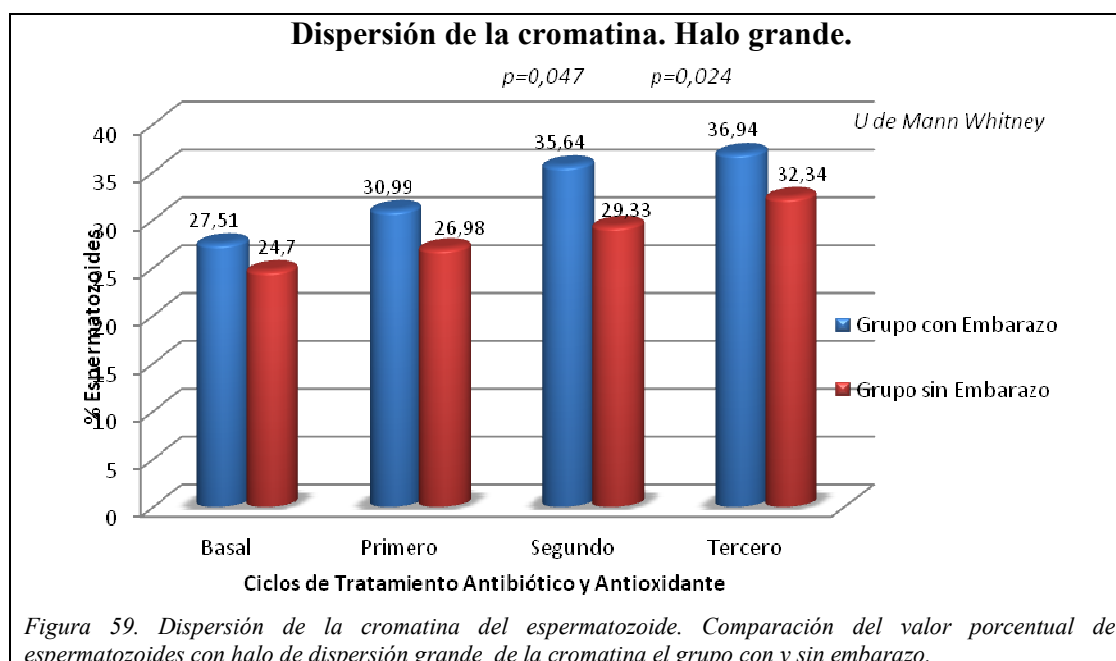
Tabla XXVII-A. Alteraciones de la pieza principal del espermatozoide en función del embarazo a diferentes tiempos de tratamiento. Comparación de medias.

5.3.7 Dispersión normal de la cromatina del espermatozoide

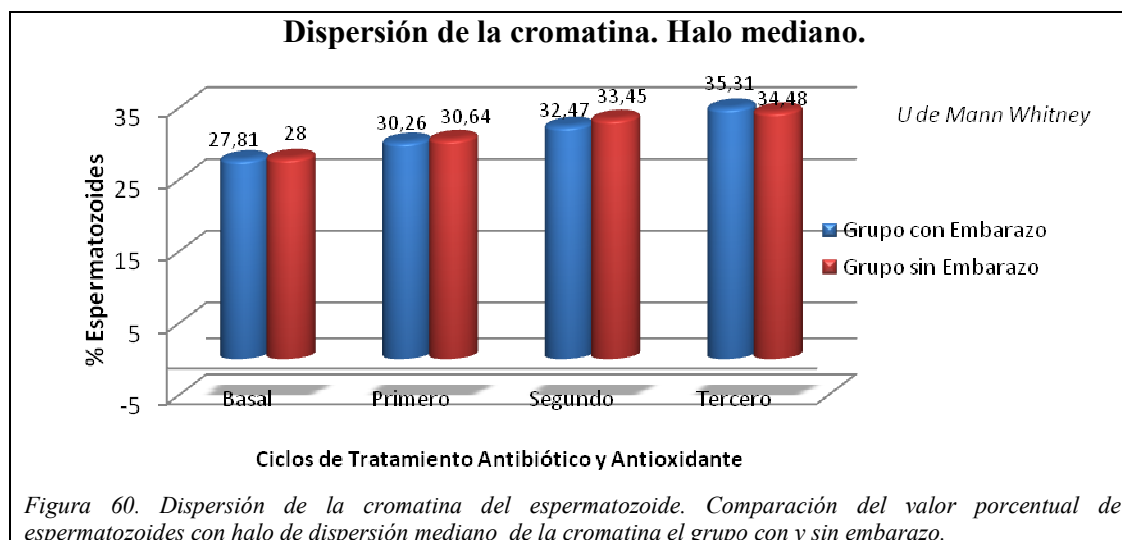
El porcentaje de espermatozoides con dispersión normal de la cromatina fue mayor en el grupo de pacientes con embarazo para todas las muestras estudiadas en los diferentes ciclos de tratamiento. Se encontraron diferencias significativas al realizar la comparación entre grupos, correspondientes a las muestras del segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$). (Figura 58) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)



El comportamiento de la variable: halo grande de dispersión de la cromatina del espermatozoide, mostró diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos con y sin logro del embarazo, para el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U de Mann Whitney*). Las cifras promedio del número de espermatozoides con halo de dispersión grande, fue mayor en todas las muestras analizadas del grupo de pacientes con embarazo positivo que en las del grupo control. (Figura 59) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)

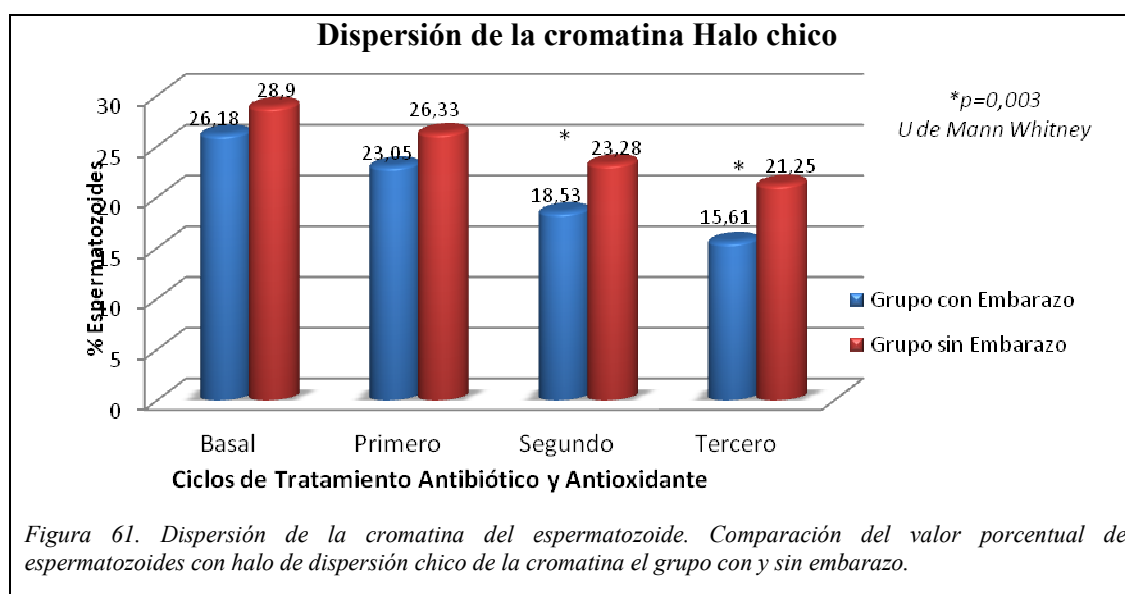


Por otra parte, sin que la diferencia entre grupos fuera estadísticamente significativa, el halo de dispersión de la cromatina mediano fue menor en el grupo de pacientes con embarazo respecto al no embarazo. (Figura 60) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)

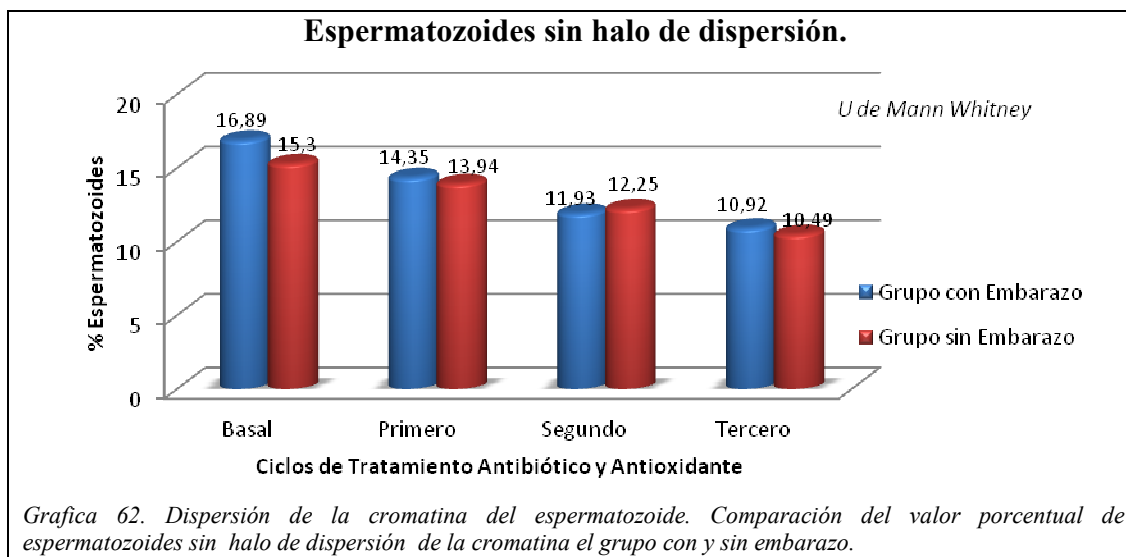


5.3.6 Dispersión anormal de la cromatina del espermatozoide

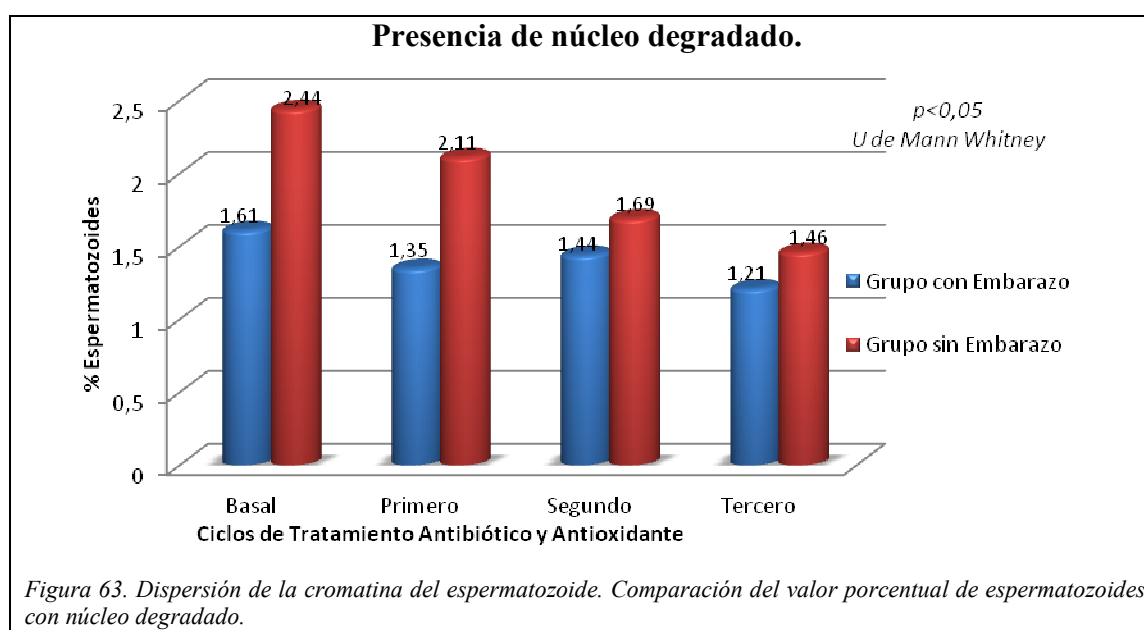
El número de espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina clasificado como chico, fue menor en todas las mediciones hechas, en los pacientes con embarazo, comparativamente con los pacientes del grupo de no embarazo. Esta diferencia de medias fue significativa para el segundo y tercer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$; *U Mann Whitney*). (Figura 61) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)



La presencia de espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina no muestra diferencias estadísticas comprobables entre los dos grupos, pero si se observa menor número de estas células en el grupo de pacientes con embarazo. (Figura 62) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)



La presencia de núcleos degradados resultó ser un rasgo significativo para la muestra basal y la correspondiente al primer ciclo de tratamiento ($p < 0,05$: *U Mann Whitney*), observándose un mayor porcentaje de estas células en las muestras de los pacientes sin embarazo; este tipo de núcleos se presentan en porcentaje menor a lo largo del tiempo de tratamiento en los pacientes que no logran el embarazo y se mantiene con cambios mínimos en el grupo de pacientes con embarazo. (Figura 63) (Tabla XXVIII-A y B Anexo)

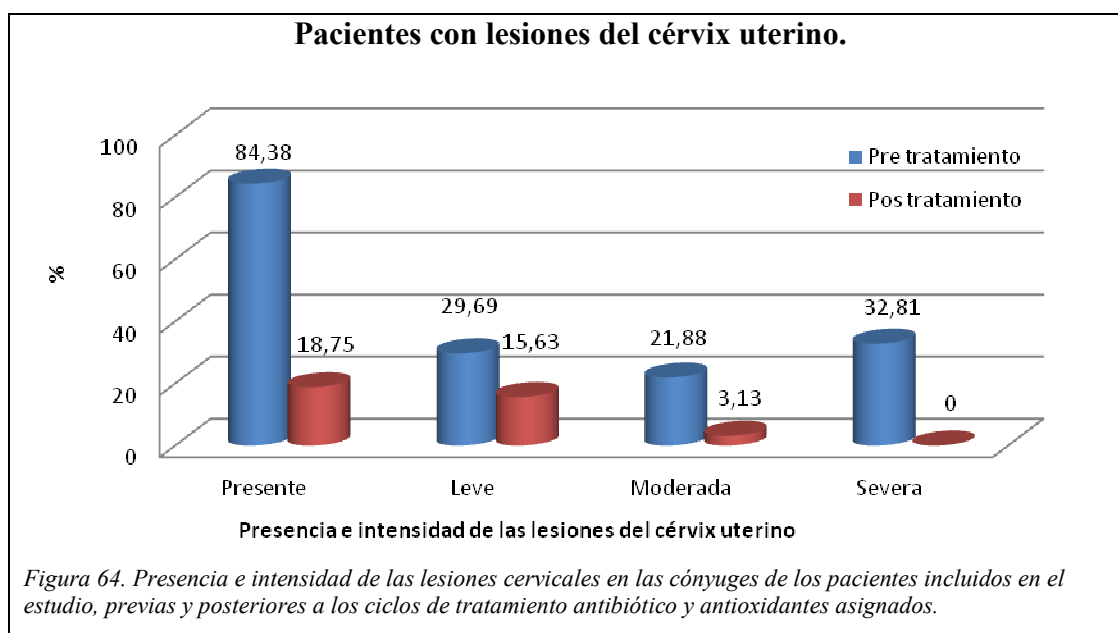


5.4 Efecto del tratamiento sobre la patología ginecológica

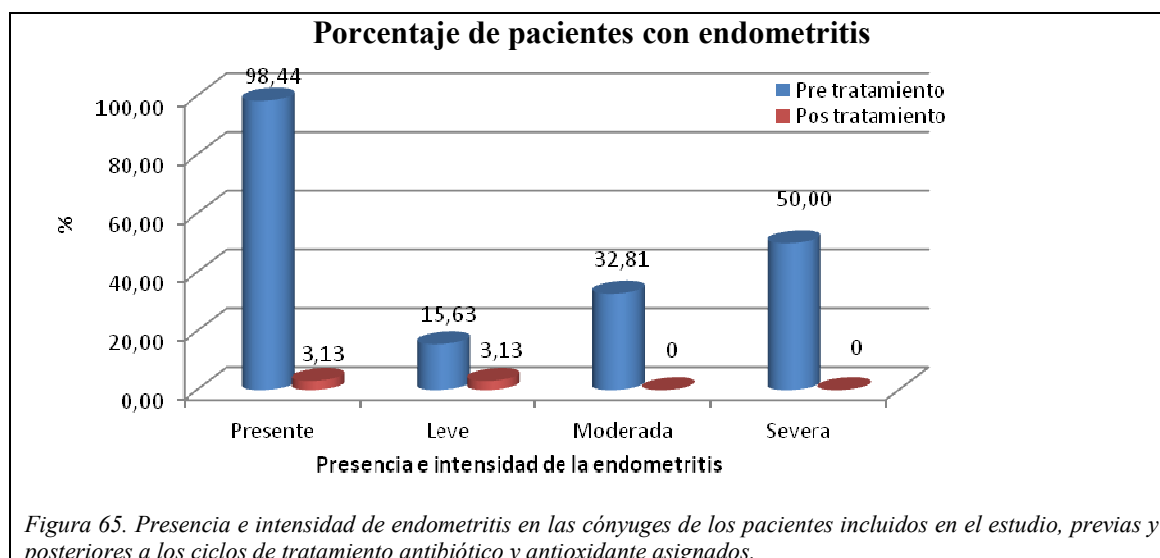
5.4.1 Cambios clínicos

Se investigó en las 64 pacientes mediante abordaje clínico y exploración ginecológica la presencia de lesiones relacionadas con el estado comprometido de salud de la paciente así como de las relacionadas con la infertilidad. Estas lesiones correspondieron a cervicitis, endometritis, secuelas cicatriciales y falla ovárica.

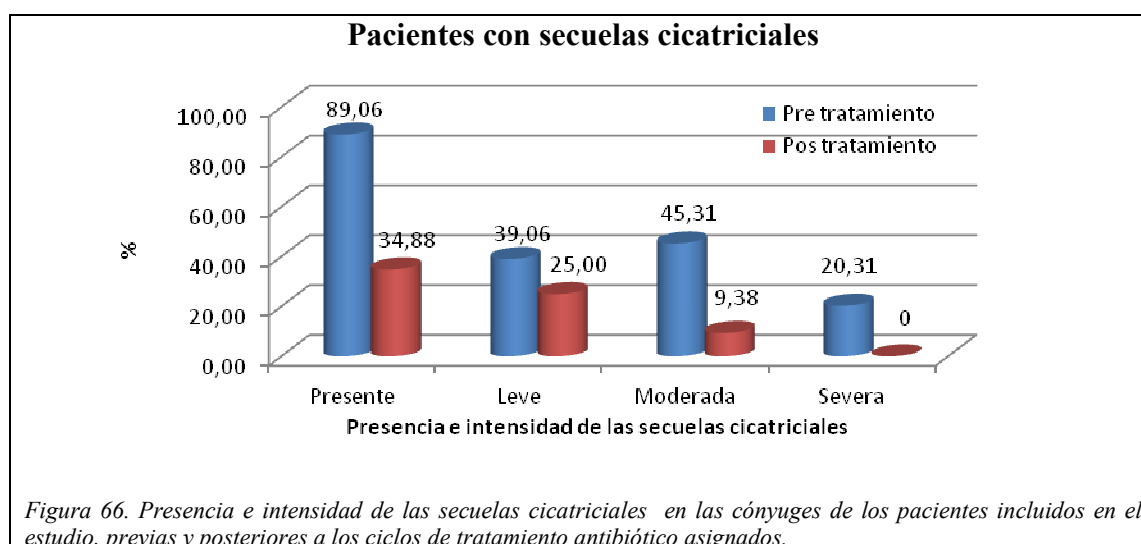
El 84,38% de las pacientes presentó lesiones del cérvix uterino previas a la administración de tratamiento antibiótico y antioxidante, siendo estas, calificadas como severas en el 32,81%, seguidas de un 21,88 % lesiones moderadas y un 29,69 % de lesiones cervicales leves. Una vez concluidos los ciclos de tratamiento que fueron necesarios administrar, se reportó, un 18,75% de pacientes con lesión cervical, registrándose intensidad leve en un 15,63%, moderada en un 3,13% y no se observaron casos severos del cuadro clínico. Los resultados de estos hallazgos se representan en la figura 64 y (Tabla XXIX-A y B).



La mayoría de las pacientes (98,44%), presentaron endometritis caracterizada por el sangrado menstrual atípico y la oligomenorrea, este diagnóstico se observó en un 3,13 % de las pacientes al finalizar los tratamientos asignados. La endometritis severa (50 %) y moderada (32,81 %) reportada antes de iniciar el tratamiento desapareció una vez terminado los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. (Figura 65) (Tabla XXIX-A y B)

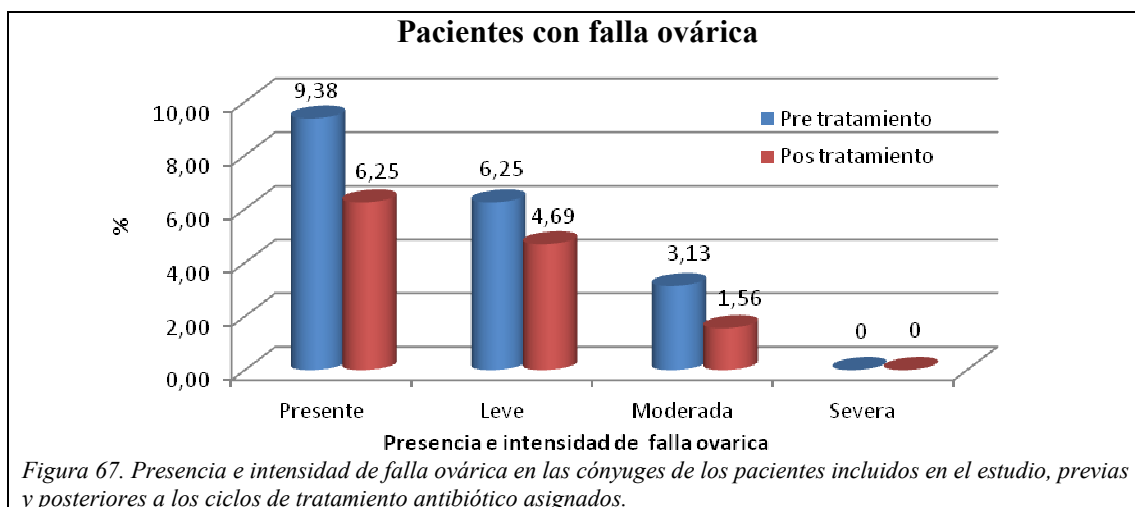


La distopia uterina, la enfermedad pélvica inflamatoria crónica, la endometriosis y lesiones tubarias, consideradas como, secuelas cicatriciales de la infección crónica, se presentaron en un 89,06% de los pacientes previo al inicio del estudio, una vez concluido el total de los tratamientos administrados este valor se redujo a un 34,38%. La intensidad en la presentación de las secuelas cicatriciales se redujo considerablemente al finalizar el estudio obteniendo reducciones de 20,31 a 0 % para la presentación severa del cuadro pretratamiento y post-tratamiento respectivamente. El resto de las variables y su porcentaje de aparición se muestran en la figura 66 y en la Tabla XXIX-A y B



La falla ovárica fue uno de los antecedentes clínicos menos frecuentes (6 pacientes) presentándose 9,38% de casos pre-tratamiento y 6,25 % una vez que terminaron los ciclos de terapia administrada. Al finalizar el estudio no se registraron

casos en los que fuera evidente falla ovárica. Los resultados clínicos colectados se encuentran en la Tabla XXIX-A y B y se representan en la figura 67.



| Padecimientos ginecológicos | | | | | | |
|-----------------------------|----------|----------|---------|----------|--------------|----------|
| Lesiones Ginecológicas | Presente | | Ausente | | Se desconoce | |
| | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto |
| Lesiones Cervicales | 84.38 | 18.75 | 15.63 | 79.69 | 0.00 | 1.56 |
| Endometritis | 98.44 | 3.13 | 1.56 | 96.88 | 0.00 | 0.00 |
| Secuelas Cicatriciales | 89.06 | 34.38 | 1.56 | 51.56 | 9.38 | 14.06 |
| Falla Ovárica | 9.38 | 6.25 | 87.50 | 92.19 | 3.13 | 1.56 |

Tabla XXIX-A. Porcentaje de pacientes con lesiones ginecológicas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante.

| Intensidad de los padecimientos ginecológicos | | | | | | |
|---|---------|----------|----------|----------|---------|----------|
| Lesiones Ginecológicas | Leve | | Moderada | | Severa | |
| | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto |
| Lesiones Cervicales | 29.69 | 15.63 | 21.88 | 3.13 | 32.81 | 0.00 |
| Endometritis | 15.63 | 3.13 | 32.81 | 0.00 | 50.00 | 0.00 |
| Secuelas Cicatriciales | 39.06 | 25.00 | 45.31 | 9.38 | 20.31 | 0.00 |
| Falla Ovárica | 6.25 | 4.69 | 3.13 | 1.56 | 0.00 | 0.00 |

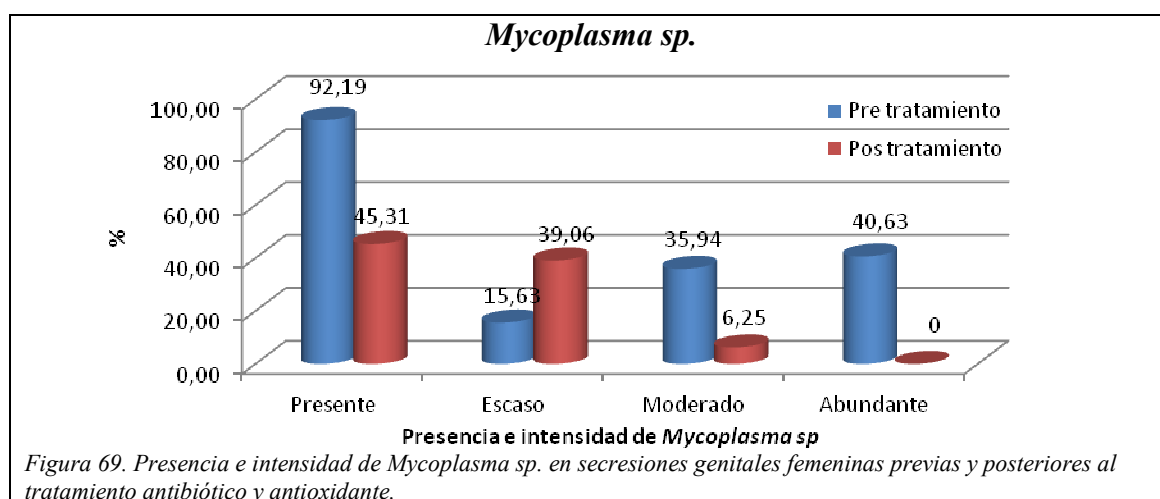
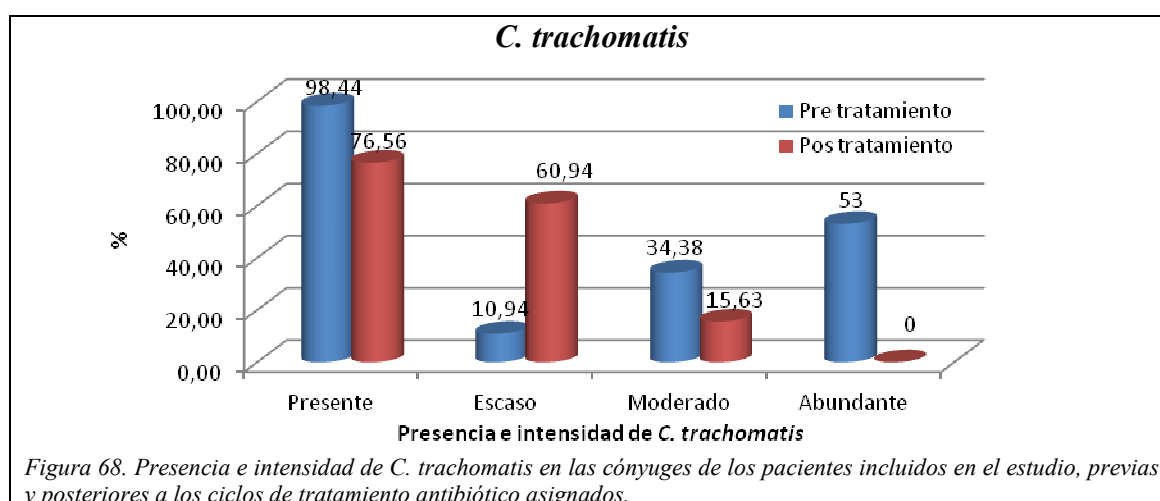
Tabla XXIX-B. Porcentaje de pacientes con lesiones ginecológicas con diferentes grados de lesiones ginecológicas previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante.

5.4.2 Concentración de bacterias en el exudado cérvico vaginal

C. trachomatis se encontró en un 98,44% de las muestras genitourinarias de las pacientes pre-tratamiento y se redujeron sus cifras a 76,56% una vez terminados los ciclos de terapia administrados. En un 53,13% de las muestras analizadas pre tratamiento se encontraron abundantes bacterias de morfología compatible con *C. trachomatis*, Al terminar el tratamiento ninguna de las pacientes presentó clamidias en

concentración abundante. En general la concentración de éstas bacterias se redujo a medida de la progresión de los ciclos de tratamiento. (Figura 68) (Tabla XXX-A y B)

Mycoplasma sp. se logró identificar en un 92,19% de las muestras genitales de las pacientes y al finalizar los esquemas de terapia antibiótica se redujo su presencia al 45,31% de los casos. Se registraron cifras de 40,63% para la concentración abundante de bacterias de morfología compatible con *Mycoplasma sp.* y estas cifras se redujeron a 0 % una vez terminado el tratamiento. (Figura 69) (Tabla XXX-A y B)



| Porcentaje de pacientes con bacterias | | | | | | |
|---------------------------------------|----------|----------|---------|----------|--------------|----------|
| Bacteria | Presente | | Ausente | | Se desconoce | |
| | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto |
| <i>C.trachomatis</i> | 98.44 | 76.56 | 1.56 | 21.88 | 0.00 | 1.56 |
| <i>Mycoplasma sp.</i> | 92.19 | 45.31 | 7.81 | 54.69 | 0.00 | 0.00 |

Tabla XXX-A. Presencia de bacterias en secreciones genitales femeninas, previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante

| Porcentaje de pacientes con diferentes concentraciones de bacterias | | | | | | |
|---|---------|----------|-----------|----------|------------|----------|
| Bacteria | Escasas | | Moderadas | | Abundantes | |
| | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto | Pre-Tto | Post-Tto |
| <i>C.trachomatis</i> | 10.94 | 60.94 | 34.38 | 15.63 | 53.13 | 0.00 |
| <i>Mycoplasma sp.</i> | 15.63 | 39.06 | 35.94 | 6.25 | 40.63 | 0.00 |

XXX-B. Concentración de bacterias en secreciones genitales femeninas, previas y posteriores al tratamiento antibiótico y antioxidante

5.4.3. Recuperación de la fertilidad

A partir del seguimiento clínico de las parejas participantes en éste estudio se recabaron datos acerca de la búsqueda de embarazo y el resultado de ella, para evaluar el resultado del tratamiento antibiótico y antioxidante indicado. Los datos que se analizaron corresponden a 57 de las 64 parejas, que pudieron ser encuestadas. A reserva de dos de ellas, en las que aún no se les indicó intentar la procreación, por estar recibiendo tratamiento, las 55 parejas restantes se expusieron al embarazo retirando el preservativo como método de anticoncepción o bien iniciaron nuevos ciclos de inseminaciones intrauterinas.

En un total de 27 mujeres (49,09%) se produjo el embarazo, que evolucionó y culminó satisfactoriamente, sin complicaciones. Dieciséis de estas pacientes recibían un refuerzo del tratamiento antibiótico cuando se logró embarazo, mientras que 11 habían terminado el antibiótico esquema asignado.

Veintiocho de las parejas (50,90%) no lograron procrear. En dos de ellas, luego de una prueba de embarazo positivo, se registró pérdida gestacional temprana (en las primeras 6 semanas).

Aunque no las consideramos para el análisis estadístico, al momento de escribir ésta tesis se reportaron dos parejas más que tuvieron hijos sanos a partir de los embarazos logrados al término del tratamiento antibiótico.

Para dar seguimiento a los objetivos de la tesis se consideraron solamente dos grupos:

3. Pacientes masculinos cuyos cónyuges lograron el embarazo (Grupo embarazo)
4. Pacientes masculinos cuyos cónyuges no se han embarazado pos-tratamiento (Grupo no embarazo).

El análisis estadístico aplicado a los resultados de las pruebas de laboratorio descritas en la tesis se realizó solamente en función de estos dos grupos.

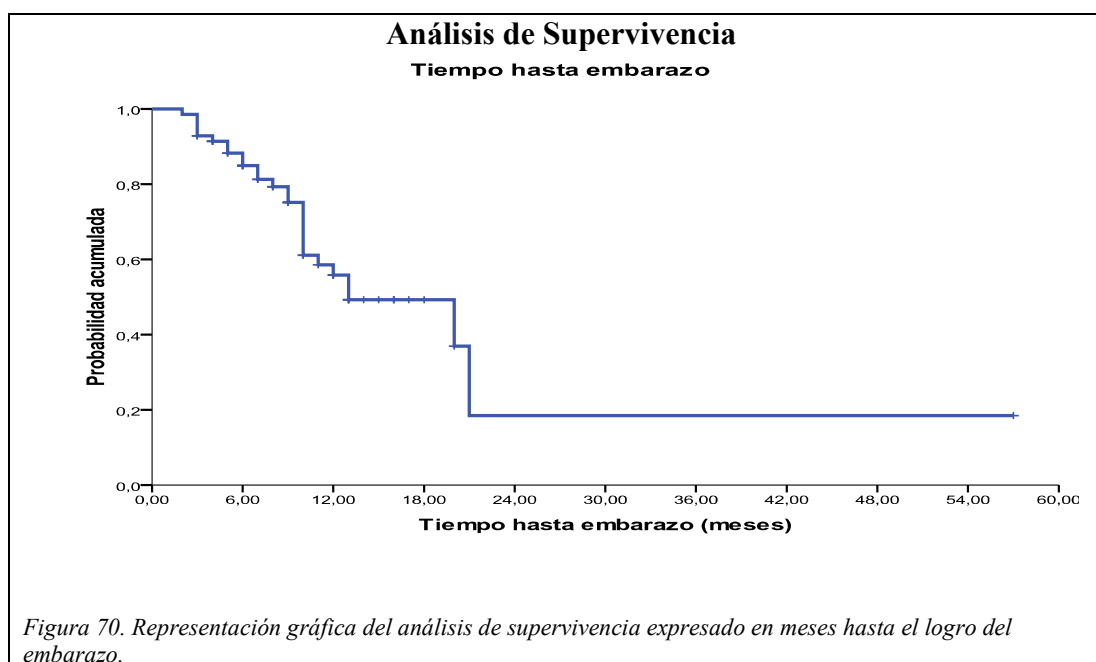
Para establecer si existen parámetros clínicos o de laboratorio con valor predictivo para el logro de embarazo sin complicaciones, se aplicó un análisis estadístico a variables que se consideró que pudieran ser importantes en ése sentido. Para éste análisis se consideraron dos grupos:

- Pacientes masculinos cuyos cónyuges lograron el embarazo y nacimiento del producto sin complicaciones (Grupo embarazo)
- Pacientes masculinos cuyos cónyuges no lograron procrear (Grupo no embarazo).

5.5 Identificación de parámetros de valor predictivo para el embarazo

5.5.1 Análisis del tiempo hasta el embarazo

Para llevar a cabo el análisis del tiempo hasta el embarazo (TE) se calculó dicho tiempo como la diferencia entre la fecha de inicio del tratamiento y la fecha en la que la pareja consiguió el embarazo, en aquellas parejas que no se quedaron embarazadas se utilizó como última fecha el momento de realización del análisis estadístico. La mediana de TE para los 70 pacientes fue de 13 meses (IC al 95% de 6,56 a 19,43) (Figura 70).

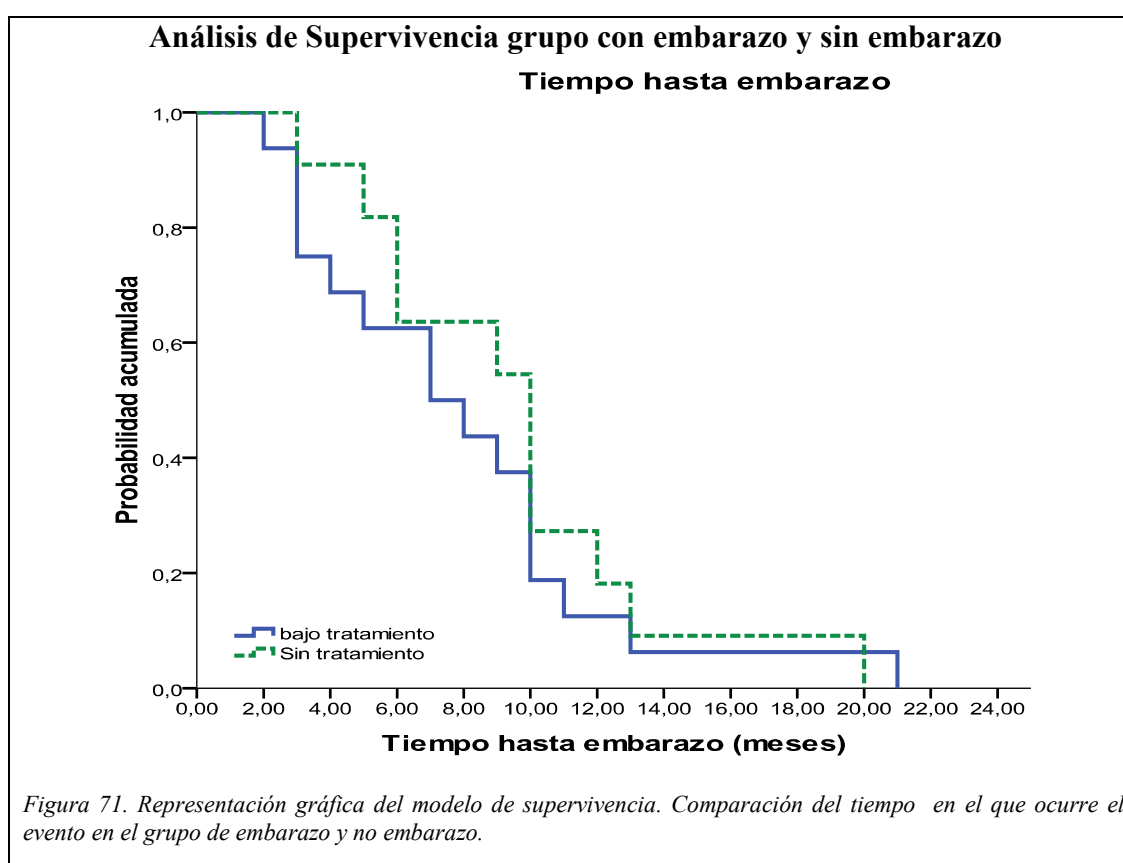


El análisis del TE nos permitió el cálculo de la probabilidad de embarazo a lo largo del tiempo. Como se muestra en tabla XXXI en donde se puede ver que la probabilidad de embarazo se incrementa de forma notoria a partir de la sexta semana de

tratamiento, pero que apartir de 18 semanas, la probabilidad de emabarazo, ya no se modifica.

| Tabla XXXI. Probabilidad de embarazo en funcion del tiempo de tratamiento | | |
|--|--------------------------------------|---|
| Análisis de supervivencia | | |
| Tiempo en meses | Probabilidad de embarazo en % | Intervalo de Confianza al 95% IC |
| 3 | 1,4 | 0 – 4,1 |
| 6 | 15 | 7,3 – 22,6 |
| 9 | 24,8 | 13,6 – 35,9 |
| 12 | 44,1 | 29,8 – 58,4 |
| 15 | 50,7 | 35,4 – 65,9 |
| 18 | 50,7 | 35,4 – 65,9 |
| 21 | 81,5 | 53,3 – 100 |
| 24 | 81,5 | 53,3 – 100 |
| 27 | 81,5 | 53,3 – 100 |
| 30 | 81,5 | 53,3 – 100 |
| 33 | 81,5 | 53,3 – 100 |
| 36 | 81,5 | 53,3 – 100 |

Se analizaron las probabilidades de embarazo mediante el modelo de análisis de supervivencia, en el grupo de pacientes con embarazo. Cuando se consiguió embarazo bajo tratamiento antibiótico y antioxidante (n=16), la mediana fue de 7 meses (IC al 95% de 3,1-10,9). Los pacientes que lograron embarazo una vez terminado el esquema de tratamiento asignado (n=11), presentaron una mediana de 10 meses (IC al 95% de 7,1-12,9). La diferencia registrada entre las dos curvas de TE no resultó estadísticamente significativa ($p=0,56$). (Figura 71)



5.5.2 Modelo multivariante de Cox (Tiempo al embarazo)

Con la finalidad de encontrar un modelo multivariante que ayude a la predicción del embarazo utilizando para ello el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, observamos que ninguna de las variables recogidas en las dos primeras consultas generaba un modelo significativo para predecir el evento. Sin embargo, cuando en el análisis se incluyeron los datos recogidos en la tercera visita se obtuvo el siguiente modelo:

Tabla XXXII. Variables de predicción de embarazo según el modelo multivariante de Cox

| | β | HR | IC 95% | p |
|----------------------------------|---------|--------|------------|------|
| Morfología defecto Cabeza | -0,116 | 0,89 | 0,79-0,99 | 0,05 |
| Bacterioespermia global | | | | |
| <i>Ausente</i> | | 1 ref. | | |
| <i>Leve</i> | -1,710 | 0,18 | 0,02-1,81 | 0,14 |
| <i>Moderada</i> | -2,249 | 0,10 | 0,01-1,05 | 0,06 |
| <i>Abundante</i> | -2,933 | 0,05 | 0,004-0,71 | 0,03 |

Según el modelo obtenido, las dos variables independientes que ayudarían a predecir el embarazo sería la “Morfología defecto de cabeza” que es una variable definida sobre una escala cuantitativa discreta con un coeficiente $\beta=-0.116$ (HR=0.59) nos indicaría que al ir aumentando el valor en esta escala la pareja reducirían la probabilidad de embarazo en un 11% [$100*(1-0,89)$] siempre que el valor de la variable “Bacteriospermia global” se mantuviera en el mismo valor. La segunda variable independiente que entra en el modelo “Bacteriospermia global” está definida sobre una escala cualitativa ordinal que va desde la ausencia hasta la abundancia de bacterias. En el caso de esta variable y tomando como valor de referencia la “Ausencia” de bacterias, lo que quiere decir es que en el caso de ausencia de bacterias en la tercera visita la probabilidad de embarazo no se modifica, si los resultados del estudio tienden hacia la modalidad “Abundante” la probabilidad de embarazo se reduce hasta en un 95% ($100*(1-0,05)$) de manera significativa ($p=0,03$). Teniendo presente que este modelo de dos variables es válido solo para esta muestra (validación interna), sería de interés probar dicho modelo en nuevas parejas con la finalidad de tener una validación externa del mismo.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Las infecciones de transmisión sexual son un verdadero problema de salud pública, que afecta a los adolescentes y adultos jóvenes y que tiene repercusión sobre la función reproductiva.

Dentro de las infecciones de transmisión sexual, las que se localizan en el tracto genitourinario producen, a través de la presencia de bacterias en el líquido seminal, deterioro de la capacidad fecundante del espermatozoide. El efecto de las bacterias sobre los espermatozoides, hasta el momento actual, es un tema muy discutido. Se ha estimado que el 15% de la infertilidad masculina está relacionada con la infección de la vía seminífera y de glándulas anexas (Keck, 1998).

C. trachomatis y *U. urealyticum* han sido reiteradamente descritas, en todo el mundo entre los patógenos bacterianos de mayor prevalencia en las enfermedades de transmisión sexual. Es por eso que para nosotros ha sido importante determinar su presencia en parejas que sufre de falla reproductiva en la región noreste de México, donde el manejo convencional de este problema, no implica la búsqueda sistemática de infecciones genitales internas ni su tratamiento.

Para este estudio, se seleccionó un grupo de pacientes en base a la positividad de las pruebas microbiológicas. El 100% presentaban infección genital por *C. trachomatis* y todas las muestras analizadas en eran portadoras también de *Mycoplasma sp.* predominando *U. urealyticum* (72,86%) y en menor grado *M. hominis*.

En la revisión bibliográfica realizada hasta el momento no hemos encontrado estudios que aborden la coinfección por *Mycoplasma* y *Chlamydia* como entidad patológica asociada a la infertilidad. Nuestro grupo de trabajo se ha interesado en la investigación de los cambios seminales y espermáticos a consecuencia de la infección combinada de éstos gérmenes. Hemos encontrado que su presencia está asociada en un porcentaje muy alto, a los casos de infertilidad masculina de causa no conocida, que cursan con abortos tempranos y recurrentes y que no se han resuelto por IIU, FIV o ICSI (Gallegos-Ávila, 2005).

Nuestro grupo publicó, en el año 2008, en un estudio realizado en 143 pacientes infértiles en donde se observó la presencia de *Mycoplasma sp.* y *C. trachomatis* en diferentes concentraciones en las muestras de líquido seminal de esos pacientes (Gallegos *et al.*, 2008).

Gdoyra y Cols. en el mismo año en un estudio realizado en 104 hombres infértiles encontraron un 15,4% de pacientes positivos para *U. urealyticum* y solo un caso (2.9%) positivo para *M. parvum*.

Los estudios sobre infecciones por Chlamydia e infertilidad en México son aun pocos y esporádicos, y se desconoce la prevalencia e incidencia de estas infecciones en la población en general. Vigil y Cols. en el año 2002, en un estudio sobre 284 parejas de una clínica de reproducción asistida de la Cd de México, obtuvieron una incidencia de infección por *Chlamydia trachomatis* del 39% en hombres con infertilidad, sin encontrar diferencias estadísticas entre éste grupo y los controles.

Desde hace casi dos décadas se propuso que *C. trachomatis* puede adherirse y penetrar al citoplasma del espermatozoide (Wolner-Hanssen y Mardh, 1984; Erbeni, 1993). En años más recientes, se ha comprobado mediante microscopia electrónica que los cuerpos elementales de Chlamydia se observan adheridos al espermatozoide tanto nivel de la cabeza como en el flagelo e incluso dentro del núcleo (Gallegos *et al.*, 2007; Vigil *et al.*, 2002b); se acepta en general que los espermatozoides infectados por *C. trachomatis* constituyen un vehículo o agente de transmisión activo que disemina la enfermedad al tracto genital femenino.

En el hombre este tipo de infecciones se manifiestan clínicamente con una sintomatología muy leve y ocasional. Al no ser detectada ni tratada oportunamente, el varón se comporta como el reservorio principal de infección para sus compañeras sexuales, generándose así un problema de importancia epidemiológica.

En las cónyuges de los pacientes que incluimos en esta tesis, se comprobó la presencia de *C. trachomatis* (98,43%), *U. urealyticum* (92,19%) y *M. hominis* (8,48%), en las muestras de exudado cérvico vaginal que se analizaron microbiológicamente al inicio del estudio.

En otros países latinoamericanos algunos investigadores han aportado datos de interés. Olivieri y cols. (1996), estudiando 41 parejas venezolanas infértiles, vieron que en el 34% de hombres y en el 24 % de mujeres había anticuerpos anti Chlamydia en suero. Más recientemente, Urbina y cols. (2010), en su estudio realizado con pacientes de una clínica de fertilidad en la ciudad de Caracas Venezuela, vieron que en el 25,40% de más de 2000 parejas estudiadas, existían anticuerpos anti *C. trachomatis* diagnosticados mediante enzimoimmunoanálisis. Por otra parte, el trabajo de Camejo y cols. realizado a principios de esta década, en el estado de Miranda Venezuela,

observaron una prevalencia de 45,2% de *C. trachomatis*, en una población de trabajadoras sexuales utilizando el mismo método de ELISA.

Son necesarias algunas consideraciones sobre la inmunopatogénesis de las infecciones por *C. trachomatis*, para explicar las diferencias que se aprecian en las cifras de incidencia publicadas por diferentes autores, dejando de lado, las que pudieran deberse a influencias climáticas, de susceptibilidad genética, o estado socioeconómico de los grupos de pacientes estudiados.

La inmunopatogénesis de las infecciones por la especie *Chlamydia* ha resultado ser muy compleja, ya que ésta bacteria estimula la respuesta inmune humoral y celular. Deben considerarse, en este sentido la liberación de citocinas, las reacciones de hipersensibilidad tardía con los subsecuentes cambios inflamatorios, y la presencia y el significado funcional de las proteínas de shock térmico (Egger-Kruse *et al.*, 2003).

Por otra parte, es bien conocido que el tracto reproductor masculino se encuentra aislado del sistema inmune; por ello, la detección de anticuerpos circulantes no es en estas enfermedades un buen indicador de la patología infecto inmune del tracto reproductor.

Cuando se pretende llegar al diagnóstico e identificación de la bacteria es necesario el uso de técnicas directas, que demuestren la presencia del germen y que nos permitan conocer el estado actual de la infección. El uso de técnicas como el enzimoimmunoanálisis, nos da información respecto al contacto que ha tenido el paciente con la bacteria, independientemente de si se encuentra activa o no la infección. Por esto, la demostración de la presencia de anticuerpos anti *C. trachomatis* no justifica por sí misma, el tratamiento de una infección sin que hubiera una fuerte correlación clínica que indicara la localización, extensión y cronicidad de la patología y sin que se hubieran descartado o confirmado la presencia de otros gérmenes copartícipes del proceso infeccioso.

La detección de anticuerpos séricos solo es de utilidad en casos de infección aguda, pero infecciones latentes, leves o limitadas a las superficies epiteliales pueden quedar fuera de la capacidad diagnóstica de estas pruebas (Schiefer, 1998; Witkin, 2002).

La diferencia de resultados obtenidos en las distintas publicaciones que analizan la presencia de *C. trachomatis*, puede ser debida a los métodos de diagnóstico utilizados. En nuestro estudio aplicamos las técnicas de IFD, debido a su sensibilidad y especificidad elevada, además de que ponen en evidencia al antígeno. La observación

microscópica de la bacteria, nos permite cuantificar los cuerpos elementales o reticulares presentes en las muestras biológicas analizadas.

Las pruebas serológicas permiten evaluar la respuesta inmunológica generada por las infecciones bacterianas, pero esta respuesta se produce sólo en aquellos casos que cursan con exposición de antígenos bacterianos a las células del sistema inmune; contrariamente, las infecciones superficiales y las que cursan con ausencia de actuación del sistema inmune, no son susceptibles de ser diagnosticadas por estos métodos serológicos.

Además, aún en los casos en que se detectara la presencia de anticuerpos anti-Chlamydia en suero, no permitiría, detectar el sitio preciso de localización de la infección, lo que es particularmente importante en aquellas parejas que presentan infección subclínica.

En los cultivos microbiológicos el límite de sensibilidad depende del número de bacterias presentes en la cantidad de muestra inoculada en los medios de cultivo. Algunos métodos sencillos como el centrifugado de las muestras, en general, pueden incrementar la eficacia diagnóstica de los cultivos bacterianos del líquido seminal (Villanueva-Díaz *et al.*, 1999); pero aún así, el cultivo bacteriano para *C. trachomatis*, que requiere a su vez de cultivo de líneas celulares establecidas, y el cultivo de la especie *Mycoplasma*, que debe realizarse en medios enriquecidos, pueden ser inaccesibles para muchos laboratorios de diagnóstico microbiológico.

Las bacterias presentes en el líquido seminal, en particular *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, inducen una respuesta inflamatoria a nivel celular, con afluencia de linfocitos, macrófagos, y células plasmáticas, todos estos elementos contribuyen en gran medida al aumento de las moléculas de ROS. Nosotros hemos observado en este trabajo y en estudio previos, la presencia de macrófagos en el líquido seminal asociados a fagocitosis de bacterias y de espermatozoides infectados; hemos visto que ésta respuesta se encuentra particularmente acentuada, en relación con la presencia de *Mycoplasmas* (Gallegos-Ávila *et al.*, 2009).

Es un hecho reconocido que *C. trachomatis* tiene relación con la disminución del potencial fértil del paciente. Ésta bacteria intracelular carente de ATP, conduce a la disminución del rendimiento energético del huésped limitando los propios mecanismos de biosíntesis. Clamidia ha desarrollado mecanismos únicos de adaptación, que le facilitan la entrada a la célula y la evasión de los mecanismos de apoptosis en la defensa celular contra la infección.

En épocas pasadas, se ha estimado que el 50% de las causas de infertilidad masculina son de origen no conocido, pero actualmente se sabe que el daño en el ADN de los espermatozoides es un factor importante en relación con la fertilidad y ha sido considerado como causa probable de disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide, aun cuando el resto de criterios de normalidad espermática y seminal se encuentren presentes.

Se ha reconocido que existen factores que producen daño irreversible en el ADN del gameto masculino, como es el caso de la producción de especies reactivas de oxígeno asociada a patología infecciosa del tracto genitourinario. Estas moléculas se caracterizan por tener un electrón desapareado y participan en reacciones de sustracción de hidrógeno, ruptura de uniones y adición de radicales. Son capaces de dañar los ácidos nucleicos, pudiendo llegar a producir la muerte celular (Hammadeh, *et al.*, 2008). Los ROS causan despolimerización del ácido hialurónico, lo que a su vez puede ser un factor que favorezca la diseminación de bacterias y retarde la reparación de los epitelios (Ponce-León *et al.*, 2009).

Altas concentraciones de ROS han demostrado tener un efecto deletéreo sobre diversas funciones del espermatozoide, sin embargo a bajas concentraciones, estas moléculas altamente reactivas participan incluso en los procesos normales de capacitación del espermatozoide (Membrillo *et al.*, 2003).

Los resultados de la técnica que aplicamos para la medición de la fragmentación de la cromatina (SCD), en los 70 hombres infértiles con IGU por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas a favor de los controles, cuando evaluamos las células con niveles normales de dispersión de la cromatina del espermatozoide. Igualmente fue significativa la diferencia encontrada para la dispersión anormal de la cromatina asociada a la fragmentación, que fue inferior al 10%, para los controles y cercanos al 45% en pacientes. Estos resultados concuerdan con los observados en 8 hombres con infección seminal por *U. urealyticum*, en el año 2000, según los resultados del artículo de Reichart y cols. (2000), quienes encontraron un 54,9% de espermatozoides con DNA fragmentado mediante la técnica SCSA.

Se han realizado trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen un mayor porcentaje de espermatozoides con roturas en el ADN, y se ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico fuera

desfavorable. Saleh y Cols. (2002), estudiaron mediante la prueba de SCSA a 92 pacientes con falla reproductiva, que no referían patología infecciosa y 21 voluntarios sanos, encontrando niveles de fragmentación mayores en el grupo de infértiles respecto a los controles y establecieron como punto considerado favorable para el embarazo, cuando el índice de fragmentación cromatínica fuera inferior a 24. En 2005 un estudio similar de Laforest y Cols. se confirmaron estas observaciones.

El incremento del número de espermatozoides con ADN fragmentado observadas en nuestros pacientes, puede ser debida a la presencia de bacterias y leucocitos en el líquido seminal y habría que considerar la aportación de ROS por restos celulares, espermatozoides lesionados e infectados, sobre el aumento de la concentración de ROS en los espermatozoides.

Mycoplasma sp. y *C. trachomatis* en conjunto, inducen la producción de niveles elevados de ROS los cuales pudieron no ser contrarrestados por los mecanismos intraespermáticos y/o seminales de anti oxidación, produciendo desequilibrio y daño en el ADN de los espermatozoides.

En el primer ciclo de tratamiento se observaron en la mayoría de los casos diferencias en el número de células con fragmentación de la cromatina de los espermatozoides pero estas no resultaron ser estadísticamente significativas.

El efecto favorable del tratamiento antibiótico y antioxidante sobre los niveles de fragmentación de la cromatina espermática fue observado en las evaluaciones posteriores al segundo ciclo de tratamiento. Los halos de dispersión grandes fueron mayores en los controles respecto a los pacientes diferencia que fue estadísticamente significativa. El porcentaje espermatozoides con halos de dispersión se incrementó con cada ciclo de tratamiento. Estos cambios favorables resultaron ser significativos en el análisis estadístico, mientras que para la presencia de halos medianos, considerados también como normales no hubo diferencias significativas.

El tránsito de los espermatozoides desde el testículo y el epidídimo, hasta su eyeción depende de la velocidad de producción de espermatozoides y el tiempo que tardan estos en transitar por el epidídimo, el cual varía entre 2 y 12 días. Se estima que un espermatozoide puede tardar al menos 74 días para alcanzar su maduración partiendo desde el estadio espermatogonial, para llegar a formar parte del eyaculado. Durante todo este tiempo de maduración y tránsito, el espermatozoide es susceptible a modificaciones moleculares y subcelulares secundarias a la administración del tratamiento antibiótico y antioxidante.

En el grupo de pacientes que estudiamos, no existieron diferencias significativas en los niveles de fragmentación de la cromatina, después de terminar el primer ciclo de tratamiento, sino hasta después del segundo ciclo de tratamiento administrado. Pueden relacionarse así estos valores con el tiempo que tarda la espermatogénesis y el tránsito del espermatozoide por los conductos de la vía seminífera y el tiempo al que fueron expuestos al tratamiento.

Dentro de los criterios de clasificación sugeridos en la prueba de fragmentación de la cromatina que empleamos, se encuentran los espermatozoides carentes de halo de dispersión y los núcleos espermáticos degradados para éstos dos parámetros no se registraron diferencias significativas en el análisis del grupo control con el de pacientes.

La ausencia de halo de dispersión de la cromatina y la degradación nuclear se equipararon con la presencia de espermatozoides muertos diagnosticados mediante la prueba de vitalidad espermática. El comportamiento de ambos parámetros fue muy similar, encontrando que a medida que se incrementaba el número de células muertas, el número de núcleos degradados y espermatozoides sin halo también se incrementaba.

Los Micoplasmas son bacterias productoras de ROS, particularmente del ion superóxido y de peróxido de hidrógeno. Se ha comunicado que los procesos infecciosos ocasionados por *C. trachomatis* y *Mycoplasma* están implicados en la muerte de los espermatozoides. Las infecciones por estos patógenos están relacionadas con la inducción descontrolada de apoptosis espermática. La apoptosis ocurre de forma normal en células espermáticas y espermatozoides como un mecanismo de regulación de la espermatogénesis (Holstein *et al.*, 2003). Sin embargo en procesos infecciosos ocurre liberación de citocinas que provocan daño a la célula; este daño también puede ser ocasionado por el contacto directo de la célula espermática con las moléculas que forman parte estructural de la membrana o los productos de secreción de las bacterias.

En sus estudios Gorga y Cols. (2001) y Satta y Cols. (2005). concluyeron que la composición molecular de la membrana de *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, podrían ser inductores directos de la apoptosis espermática. En la membrana celular de estas bacterias se encuentran moléculas como las porinas y los lipopolisacáridos que se ha visto, son agentes que inducen el inicio de la apoptosis en los espermatozoides cuando son expuestos a estas moléculas nocivas (Gorga *et al.*, 2001; Satta *et al.*, 2006).

Mecanismos de ésta naturaleza pudieran estar implicados en la generación de los niveles de células muertas presentes en el líquido seminal de nuestros pacientes, en los que se registró para las muestras basales analizadas un porcentaje mayor (18,09%) que

el de los controles (11,79%). En general se registró disminución del porcentaje de espermatozoides muertos, cuando se incrementó el número de ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante.

Otro factor importante a considerar como origen del daño en el ADN del espermatozoide, es la presencia de varicocele. Estudios recientes han demostrado que los pacientes con varicocele presentan frecuencias altas de ADN fragmentado comparado con los hombres fértiles. Entre los antecedentes clínicos referidos por los pacientes de nuestro estudio, el varicocele estuvo presente en 19 de ellos, (27%), siendo bilateral en 21% en unilateral en el 6% restante. El nivel de fragmentación de la cromatina medido por la prueba SCD, en los pacientes con antecedente de varicocele fue de 36,5%. Este hallazgo coincide con el publicado por Enciso y Cols. en el 2006 a partir de un estudio realizado con 18 pacientes con varicocele, en los que se evaluaron los niveles de fragmentación de la cromatina del espermatozoide mediante el mismo test, encontrando niveles de fragmentación del 32%, 2,6 veces mayor a los encontrados en el grupo de normozoospermicos fértiles.

De acuerdo a los resultados de éste trabajo, hubo cambios favorables en el daño del ADN, medido a través de los niveles de fragmentación de la cromatina espermática por la prueba SCD, una vez que se administró tratamiento antibiótico combinado con antioxidantes. Estos cambios pudiesen deberse a la disminución de bacterias en el líquido seminal, como parte del efecto del tratamiento antibiótico utilizado.

Los antibióticos elegidos en base a la susceptibilidad demostrada *in vitro* para Micoplasmas, incluyó algún tipo de macrólidos, tetraciclina y quinolonas, que se caracterizan por alcanzar concentraciones altas a nivel intracelular. La disminución en las bacterias intra y extracelulares trae como consecuencia la disminución en la concentración de células inflamatorias y por tanto disminución en los niveles de moléculas de oxígeno reactivo.

De hecho, un aspecto importante relacionado con la inflamación del tracto genital y la respuesta a la infección fue la presencia de células inflamatorias en el líquido seminal de los casos que estudiamos. Las cifras que presentaron nuestros pacientes, fueron incluso inferiores a las sugeridas por la OMS en el 2010 como valores normales ($<1.0 \times 10^6$). La media de la concentración de leucocitos para el grupo de pacientes infértiles con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, fue de 265×10^3 ($0-1100 \times 10^3$). Sin embargo, al analizar la concentración de leucocitos, encontramos diferencias significativas entre muestras seminales de hombres del grupo control y

pacientes. Los valores de referencia para la concentración de leucocitos en el líquido seminal y su significado, son discutidos en la actualidad, pero su presencia está considerada indudablemente como un indicador de infección activa del tracto genital.

Yanushpolsky *et al.*, en 1995 encontraron que cerca del 80% de las muestras con leucocitospermia son microbiológicamente negativas y en muchos hombres esta alteración seminal puede resolverse sin tratamiento. Los mismos autores en 1996 observaron diferencias clínicamente significativas en concentraciones mayores a 2×10^6 leucocitos /ml de líquido seminal. Aitken *et al.*, (1995), sugieren que la concentración de leucocitos en el eyaculado en el rango considerado patológico por la OMS no afecta el estado de fertilidad de los sujetos. Por otra parte Punab *et al.*, (2003) menciona que los niveles establecidos por la OMS son demasiado altos.

Los pacientes incluidos en nuestro estudio mostraron mayor grado de afectación en el ADN de los espermatozoides en forma proporcional a la concentración de leucocitos, esto indica que aunque los valores reportados estén por debajo de lo sugerido por la OMS, la presencia de estas células está relacionada con el incremento del daño en el ADN del espermatozoide. Álvarez *et al.*, (2002), encontraron que la integridad del ADN se vio afectada en muestras de semen de pacientes con leucocitospermia.

Para analizar el significado de las cifras bajas de leucocitos en el líquido seminal de los pacientes que estudiamos, deberemos tomar en cuenta, por una parte, la pobre respuesta inmune celular que despertaría una infección localizada en una superficie epitelial de revestimiento, o la presencia de bacterias colectadas en la luz o cavidad de órganos huecos, como el epidídimo o las vesículas seminales, los conductos seminales o de los acinos glandulares de la próstata. También habrá que considerar la fluctuación en la concentración de células inflamatorias, propia de un episodio agudo de inflamación a uno crónico, que implique lesiones cicatriciales y obstructivas. Otra explicación válida para las variaciones en el recuento leucocitario en el líquido seminal cuando hay infección de la vía seminífera, es la dificultad para la expulsión de secreciones físicamente alteradas por la afectación de las mismas unidades glandulares, como es el caso de la hiperviscosidad del líquido seminal.

Al finalizar el tratamiento de la infección genital interna por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, las cifras de leucocitos seminales, de los pacientes estudiados para ésta tesis, variaron entre 0 y 800×10^3 , la media fue de 100×10^3 , y hubo 14 casos en los que según la técnica de mieloperoxidasa, la cifra de leucocitos fue de 0. Este cambio se

dio paralelamente a la disminución de la concentración de ambas bacterias, lo que consideramos evidencia suficiente de la eficacia del tratamiento para el control del proceso infeccioso.

Los leucocitos son la principal fuente de ROS en el eyaculado y el exceso de ROS es extremadamente perjudicial para la motilidad y la función de la membrana; se afirma también que las concentraciones altas de ROS, pueden causar la muerte de las células espermatogénicas (Alvarez *et al.*, 2002). Desde el año de 1994, algunos estudios han demostrado, por ensayos hechos en oocitos de hámster, que la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida se asoció a alteraciones de la función de la membrana plasmática (Vigil *et al.*, 1994). Con esta base podremos asumir que el daño en la membrana por ROS, a su vez asociado a la infección y a la leucocitospermia, es otro mecanismo que conduce a la infertilidad en el hombre.

El examen microscópico en fresco, con técnicas citológicas de alta resolución y alto contraste, que hemos empleado en nuestro estudio, nos permitió registrar como parte de los cambios patológicos consecuentes al proceso infeccioso, el esfacelo constante de células de revestimiento epitelial, portadoras de inclusiones bacterianas y de cambios citolíticos; también fue una observación consistente la presencia de acúmulos de tamaño variable, de fragmentos celulares con agregados de partículas bacterianas incluidos o adheridos a ellos. Con respecto a este hallazgo pudiéramos afirmar que forman parte de los cambios secundarios a la infección y a la inflamación y que aunque no nos hemos enfocado en este trabajo a la medición de ROS producidos por estos elementos, en forma aislada, han sido referidos ya como fuente de éstas moléculas nocivas (Ramos *et al.*, 2002).

Refiriéndonos a los aspectos físico-químicos del análisis seminal, en el grupo de pacientes se encontraron valores mínimos de volumen seminal de 0,7mL y máximos de 9,0 mL. La OMS (2010) sugiere como normal, volúmenes mayores de 1,5mL e inferiores de 6mL. En los pacientes que presentaron volúmenes mayores de 6 mL (8 pacientes), se puede sugerir una relación con la infección de la vía seminífera y, en particular, de las vesículas seminales. En éstos pacientes se registró después del primer ciclo de tratamiento con antibióticos y antioxidantes, una disminución en el volumen del líquido seminal sin llegar a los límites inferiores considerados como normales. En el grupo de pacientes que estudiamos, el volumen seminal fue bajo solo en 14 del total de las mediciones incluyendo las lecturas basales, como las posteriores a los tratamientos, sin que se observara una distribución normal de ésta variable. Sin embargo una vez que

se descarta deficiencia androgénica y la pérdida de fracciones del eyaculado durante la recolección del líquido seminal, el volumen seminal bajo pudiera relacionarse con patologías obstructivas de los conductos excretores a nivel del epidídimo y conducto deferente, como lo han señalado otros autores para la infección gonocócica y por *C. trachomatis* (Tapia y Rojas, 2003); nosotros consideramos que con más probabilidad pudiera ser debida a la atrofia e hipofunción de las vesículas seminales, afectadas crónicamente por la infección e inflamación. Para nosotros otra posible explicación para un proceso crónico sería la hiperviscosidad seminal con dificultad para la emisión completa del eyaculado, que al igual que en nuestro estudio se ha descrito en casos de infección por *U. urealyticum* (Wang *et al.*, 2006)

En relación con el desarrollo de orquiepididimitis, si bien en la fase inicial de la infección por *C. trachomatis*, los gérmenes se localizan en la superficie de las células infectadas, las clamidias tienen capacidad de invadir el tejido conectivo sub epitelial en las fases más avanzadas de la infección. La llegada de células de inflamación: polimorfonucleares, histiocitos y células plasmáticas, con la ulterior fibrosis intersticial, daría origen en primera instancia a la orquiepididimitis subaguda y ulteriormente a su estadio crónico que pudiera cursar con fases de reagudización. Estas lesiones pueden llevar a la formación de quistes epididimarios e hidrocele y llegar a la obstrucción total del conducto epididimario con la consecuente oligospermia obstructiva; en el caso extremo el proceso infeccioso e inflamatorio crónico puede conducir a la atrofia testicular, en la que la oligospermia pasaría a ser del tipo secretoria.

En nuestro estudio la concentración de espermatozoides en el líquido seminal, del grupo de pacientes analizado, no mostró diferencias importantes durante el primer ciclo de tratamiento pero se incrementaron los valores durante el segundo y tercer ciclo de tratamiento administrado, lo cual nos lleva a considerar que la infección e inflamación asociadas implicaban ya un fenómeno de sub obstrucción de la vía seminífera.

En hombres con obstrucción ductal, además de que se produce disminución del volumen seminal, hay una baja concentración de fructosa y alfa glucosidasa y podrá haber oligozoospermia severa o azoospermia, aunque el tamaño testicular y los niveles de gonadotrofinas séricas sean normales (Nagler, 2008).

Aunque está bien documentado que la clamidia produce prostatitis crónica, ésta no parece ser causa de patología obstructiva de la vía espermática, a menos que haya inflamación y cicatrización a nivel de los conductos eyaculadores; la obstrucción del

conducto eyaculador no es una causa común de infertilidad, aunque la infección está presente en el 22 a 50% de estos pacientes (Dohle, 2003). Por el contrario en la mujer, es más fácil que la infección tubaria curse rápidamente hacia una cicatrización grave y obstrucción (den Hartog *et al.*, 2008; Crosignani y Rubin, *et al.*, 2000), por lo que en la práctica médica rutinaria, uno de los primeros exámenes diagnósticos en la investigación de la tardanza para procrear, es la histerosalpingografía. En nuestra opinión el algoritmo de estudio de la pareja infértil debiera incluir desde el inicio la investigación de patología infecciosa especialmente por Clamidias y Micoplasmas. Estudios radiológicos que implican una instrumentación invasiva como el antes citado, pudieran agravar los procesos infecciosos al facilitar la transferencia de gérmenes hacia la superficie ovárica y la cavidad pélvica.

En el caso del registro del color del semen no se observaron diferencias importantes, solo un predominio del color aperlado para el grupo control y aumento de la frecuencia del color amarillo en las muestras de los pacientes. Se ha sugerido que la presencia de color amarillo del líquido seminal, pudiera estar relacionada no solamente a la ingesta de carotenos en la alimentación si no, también a los tratamientos antibióticos administrados, así como a la presencia de bacterias en el líquido seminal y leucocitos activos.

Durante mucho tiempo se ha considerado que la viscosidad seminal anormal, vista en los pacientes infértiles puede ser debida a infección; la hiperviscosidad seminal corresponde, según algunos autores, a la hipofunción de las vesículas seminales que se presenta con leucocitospermia y puede ser secundaria a procesos inflamatorios post-infecciosos (WHO 1992; Gonzales *et al.*, 1992).

La hiperviscosidad seminal ha sido relacionada con alteración de la movilidad de los espermatozoides. Gonzales y cols. en 1999, realizaron un estudio en 42 hombres infértiles sin encontrar diferencias significativas en relación a la presencia de hiperviscosidad seminal y el porcentaje de espermatozoides móviles; sin embargo encontró astenozoospermia en el 63,6% de las muestras con hiperviscosidad y 35,7% en las muestras con viscosidad normal. Como parte de nuestros resultados observamos que la motilidad espermática del grupo de pacientes y controles mostró diferencias significativas para los patrones de desplazamiento curvilíneo y rectilíneo principalmente y para la suma de estos valores. Aún sin relacionarse con aumento de la consistencia o hiperviscosidad del líquido seminal, la calidad del movimiento de los espermatozoides se relacionó claramente con la infección, como pudo constatarse al observar mejoría

importante a consecuencia del tratamiento antibiótico y la disminución de la concentración bacteriana.

El pH registrado en las muestras seminales de pacientes y controles no mostró diferencias significativas ni variaciones con el tratamiento. El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo pero se ha sugerido que un pH elevado (> 8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, (OMS 2010). En nuestro estudio los valores máximos obtenidos en la medición del pH corresponden a los del grupo de pacientes, pudiendo sugerir que la presencia de bacterias incrementa ligeramente éste valor. Hacia el tercer ciclo del tratamiento se observó disminución del pH en una escala de aproximadamente 0,5. Elevaciones notorias del pH seminal de 8.6 a 9.0, han sido asociadas a infección seminal por Micoplasmas; particularmente se asociaron a la presencia de *U. urealyticum*, al comparar pacientes contra controles (Wang et al., 2006; Zheng et al., 2008).

Varios estudios han documentado una asociación entre *U. urealyticum* y la infertilidad. Gnärpe y Friberg en 1972, observaron una prevalencia de 85% en cultivos de hombres infértiles, muy diferente de la encontrada en hombres fértiles (27%). Fowlkes et al (1975), evaluaron 625 hombres con infertilidad de etiología desconocida y encontraron una correlación entre el cultivo positivo para *U. urealyticum*, con una disminución de la motilidad e incremento de defectos morfológicos del espermatozoide, asociándose frecuentemente a una disminución de su capacidad fecundante (Fowlkes et al., 1975).

Las publicaciones existentes respecto a la motilidad espermática y la infección por *C. trachomatis* presentan conclusiones contradictorias. Un gran número de estudios sugieren que no existen modificaciones en los parámetros espermáticos cuando se presenta infección por *C. trachomatis* (Zdrodowska et al., 2006; Gdoura et al., 2007; Eggert-Krouse et al., 2003). Por otra parte, otros autores han encontrado alteraciones en la motilidad espermática cuando existe infección por *C. trachomatis* (Jakiel et al., 2004). Un estudio realizado en 627 pacientes de los cuales 136 presentaba infección por *C. trachomatis*, mostraba una disminución de la calidad seminal y espermática con respecto al control. Estos cambios eran referentes a la presencia de espermatozoides normales que se redujeron en un 14,4% al volumen seminal que fue 6,4% menor en los hombres con la infección; la concentración de espermatozoides fue 8,3% más baja y la motilidad fue 7,8% menor que en el grupo control. (Veznik et al., 2004).

Nuestro grupo ha sido el único en estudiar los parámetros seminales en las coinfecciones por Clamidias y Micoplasmas encontrando afectación en la mayoría de los marcadores de función espermática y en la calidad seminal. Además hemos demostrado que estas infecciones afectan la integridad del ADN del espermatozoide humano hasta 3,2 veces más que en los pacientes sanos sin infección (Gallegos *et al.*, 2008).

Un mecanismo que podría explicar la disminución de la motilidad espermática sería la presencia de las caspasas en el líquido seminal. Estas proteínas se generan a consecuencia de la presencia de ROS, son importantes en la regulación de la apoptosis, que implica fragmentación del ADN espermático, y lleva a depleción de la celularidad en el epitelio seminífero. Entre las condiciones clínicas relacionadas con la producción de caspasas se encuentran además de la infección, la torsión testicular, el varicocele y la infertilidad inmunológica (Said, *et al.*, 2004).

El metabolismo energético a partir de la glucosa podría ser una de las vías afectadas cuando los espermatozoides se encuentran infectados, ya fuera que tuvieran bacterias que se adhieren a la superficie de la membrana o bien que estuvieran incluidas en su citoplasma modificando las rutas metabólicas convencionales. El metabolismo energético a partir de glucosa es requerido para la activación del axonema e incluye la producción y regeneración de ATP y de intermediarios como el NADPH, necesarios para las vías de señalización interna, que conducen a la fosforilación de las proteínas flagelares para la generación del movimiento. El ingreso de glucosa al citosol se da a través de transportadores como el *GLUT3* en la pieza intermedia o el *GLUT8* en la región acrosomal, o por reservas endógenas en forma de glicógeno. La glucosa es transformada en glucosa-6- fosfato por la enzima hexoquinasa, para generar ATP o NADPH, por una de tres vías, dependiendo del dominio del flagelo: la glicolítica, la vía pentosa fosfato y la vía mitocondrial de la fosforilación oxidativa; ésta última fuente principal de ATP (Olivera *et al.*, 2006). Además esta vía es afectada con el ingreso de H_2O_2 , producto del metabolismo de los Micoplasmas, el cual en concentraciones elevadas produce elevación de ROS.

Algunos de los cambios en la morfología de los espermatozoides que hemos observado en el semen de los pacientes infértiles con IGU, como son la descompactación de la cromatina, pudieran ser secundarios a la fragmentación de la cromatina, un hallazgo característico de la apoptosis; mientras que, la fagocitosis de espermatozoides pudiera resultar del reconocimiento de células apoptóticas. La coincidencia de cambios autolíticos en espermatozoides que contenían bacterias a nivel

de la pieza media, podrían estar en relación con incremento de la concentración de cisteín-proteasas y la inducción de apoptosis.

La evaluación de una pareja infértil implica una multitud de parámetros a considerar, en la mayoría de los casos, la causa de la infertilidad masculina está ligada a una o más alteraciones en los parámetros del semen. Sin embargo, la morfología de los espermatozoides, medida de acuerdo con criterios estrictos, sigue siendo el parámetro de mayor valor informativo para diferenciar entre los varones fértiles e infértiles.

Diferentes estudios indican que la morfología es el mejor predictor de la fertilidad de entre todos los parámetros evaluados del seminograma, y que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal es una característica esencial de la fecundidad *in vivo* (Liu *et al.*, 2010).

Se han establecido ciertos criterios en la evaluación de la morfología de los espermatozoides que se relacionan a factores como el tiempo de embarazo y las tasas de embarazo *in vivo* e *in vitro* y que han ayudado a definir la apariencia normal del gameto masculino, el potencial fertilizante y además pueden ser utilizados como factor pronóstico de la fertilidad (Menkveld *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010).

Menkveld y Cols (2011), establecieron un valor porcentual que define a los hombres fértiles e infértiles y este debe encontrarse entre 0 y 30% aunque se sabe que pocos son los casos que exceden el 25% de espermatozoides de forma normal. Aunque si bien, hemos encontrado trabajos que presentan la existencia de casos de fertilidad aun con morfología alterada entre 3 y 5% en procedimientos de fertilización *in vitro* (Coetzee *et al.*, 1998), inseminación intrauterina (Van Waart *et al.*, 2001) así como fertilidad *in vivo* (Van der Merwe *et al.*, 2005).

En nuestro estudio hemos encontrado niveles elevados de teratozoospermia y esta, comparada con los niveles de los controles mostró diferencias estadísticamente significativas. El promedio de espermatozoides calificados de forma normal en las muestras seminales del grupo control fue de $31,07 \pm 2,76\%$, considerado dentro de los parámetros normales sugeridos por la OMS (2010). Por otra parte para los pacientes, en la muestra basal analizada, el valor fue de $14,23 \pm 3,32\%$. Cuando analizamos el comportamiento de los valores a través de los diferentes ciclos de tratamiento encontramos que el parámetro morfología normal sufre modificaciones estadísticamente significativas.

Bonde y Cols. (1998), en Dinamarca, realizaron un estudio en 430 parejas que llevaban poco tiempo intentando el embarazo y las cuales fueron seguidas durante un

periodo de seis meses hasta a lo largo del cual, dichas parejas consiguieron o no tener un embarazo. Encontraron que la tasa de embarazo, disminuye considerablemente en relación a alteraciones en la motilidad espermática cuando esta se encuentra en valores $<30\%$ para el movimiento progresivo total.

Un estudio realizado por Menkveld y Cols. (2001), evaluó la morfología espermática de 107 pacientes fértiles y 103 infértiles encontrando valores de normalidad del 40% y 21% de espermatozoides de forma normal, respectivamente. A estos pacientes no se les realizó pruebas microbiológicas que descartaran a *Chlamydia sp.* y a *Mycoplasma sp.* Estos investigadores en general encontraron diferencias significativas para el análisis de la morfología, la motilidad y concentración espermática.

Mediante el análisis de la morfología espermática y bajo criterios estrictos en su descripción y clasificación, encontramos que los defectos predominantes para el grupo de pacientes en orden de frecuencia fueron: defectos en la pieza media del espermatozoide (31%), defectos en la pieza principal del flagelo (28%), presencia de lesiones nucleares (19%) defectos del núcleo y del acrosoma (16%), y defectos de la cabeza (6%). Estas alteraciones no presentaron la misma frecuencia respecto a las observadas en los controles, en los cuales la alteración principal correspondió a engrosamiento de la pieza media.

En los pacientes analizados en la tesis los defectos morfológicos del núcleo de los espermatozoides se redujeron principalmente en el segundo y tercer ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante administrado. Las lesiones nucleares relacionadas con daño en el ADN también decrecieron en los pacientes después del tratamiento, y estos cambios fueron estadísticamente significativos, para el tercer ciclo administrado.

Aunque se ha considerado que las características estándar de los espermatozoides son pobres predictores del éxito de la reproducción, los defectos morfológicos detectados mediante una rigurosa evaluación de la morfología de los espermatozoides y la integridad estructural de la cromatina de los espermatozoides son de importancia decisiva para el manejo de los pacientes infértiles.

Alteraciones específicas de la morfología de los espermatozoides han podido ser asociadas con un alto porcentaje de anormalidades de la cromatina de los espermatozoides, determinadas por técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente, en pacientes infértiles atendidos en clínicas de infertilidad mediante técnicas de fertilización *in vitro* e ICSI (Lewis-Jones, 2003).

La infección por *U. urealyticum* ha despertado gran interés desde hace varios años, ya que estudios previos han encontrado que esta bacteria puede desempeñar un papel etiológico en las infecciones genitales y en la infertilidad masculina.

Sanocka-Maciejewska y Cols., en 2005, analizaron las muestras seminales de 39 pacientes sin infección y 14 con infección combinada por *Escherichia coli*, *Ureaplasma urealyticum* y *Staphylococcus aureus*, encontrando en el grupo de pacientes infectados deterioro de los parámetros seminales relacionados con el volumen, concentración, motilidad, morfología y vitalidad espermática comparado con el grupo no infectado.

Zheng y Cols. (2008) concluyeron que las infecciones ocasionadas por *U. urealyticum* en el tracto genital, son un factor importante para el deterioro de la calidad del semen en los hombres subfértiles provocando disminución de alfa-glucosidasa en el epidídimo pero con afectación principal de la próstata y vesículas seminales. Estas conclusiones fueron reiteradas por Moretti *et al.*, (2009), los cuales encontraron que las bacterias de la especie *Mycoplasma*, presentes en el líquido seminal pueden contribuir al deterioro de la calidad del espermatozoide en hombres infértiles.

Recientemente, en el noreste de China, Zhang y cols. (2011) analizaron 967 muestras seminales de pacientes infértiles, en los cuales aislaron *U. urealyticum* en 16% de las muestras seminales y además reportaron en estos pacientes leucocitospermia e incremento en el número de defectos en la cabeza del espermatozoide de pacientes infectados respecto a los no infectados.

Estas conclusiones contrastan con el trabajo de Gdoura y cols. (2008), quienes informaron que los valores medios de volumen seminal, recuento de leucocitos, la concentración de espermatozoides, la viabilidad, motilidad y morfología no se relacionaron significativamente con la detección de *Ureaplasma* o *Mycoplasma* en muestras de semen. Por igual, en el trabajo de Andrade Rocha en el año 2003, concluía que no existía ninguna relación significativa entre la presencia de *U. urealyticum* y los parámetros seminales.

Aunque en la bibliografía de los últimos años se encuentran cada vez más artículos en los que se demuestra una asociación entre la infección por bacterias de la especie *Mycoplasma* con el deterioro del espermatozoide y la infertilidad masculina, no existe aún un consenso acerca del impacto negativo que *U. urealyticum* tenga sobre el tracto genital masculino y sobre parámetros espermáticos como la morfología. Posiblemente debido a que los estudios realizados varían respecto a las técnicas diagnósticas, la población de pacientes, condiciones ambientales y las condiciones

socioeconómicas ya que todos estos factores contribuyen al desarrollo e impacto biológico de la infección.

Los defectos de la cabeza del espermatozoide, encontrados en nuestros pacientes fue uno de los parámetros para los que se obtuvieron frecuencias por arriba de lo normal, con referencia a los criterios que dicta la OMS. Además el porcentaje de espermatozoides con esta alteración morfológica, se incrementó ligeramente después de los tratamientos con antibióticos y antioxidantes. Este dato que pudiera parecer contradictorio, pero debe evaluarse bajo la consideración de que el análisis se hizo en base a al 100% de células anormales y es por lo tanto un valor relativo, que pudiera verse influido por el decremento porcentual del resto de las anomalías morfológicas de los espermatozoides. Este parámetro morfológico dio cifras muy similares a las encontradas en los controles. El mismo comportamiento se vio en los defectos del acrosoma, en los pacientes, que tuvieron un incremento en el segundo y tercer ciclo de tratamiento.

Las anormalidades de la cabeza del espermatozoide expresan diferentes alteraciones subcelulares, como por ejemplo, en la organización y función de la cromatina, de la teca perinuclear, del acrosoma o en la influencia del citoesqueleto sobre la modelización del núcleo. Se han descrito como parte de la teratozoospermia, defectos de la maduración y de la compactación de la cromatina, con hipoplasia del acrosoma; pero su incidencia fluctúa a lo largo de la evolución clínica, de modo que en algunos casos se ha asociado tanto a la infertilidad como al aborto (Chemes *et al*, 1998; Zamboni, 1987).

Respecto a la asociación de alteraciones de la morfología con el aborto, un estudio realizado por Bhattacharya y Cols. (2008), en la India que incluyó 74 parejas con antecedentes clínicos de pérdida temprana de embarazo menor a 8 semanas, en los que se había presentado el aborto en al menos 2 ocasiones. Las muestras seminales de los varones fueron analizadas en conjunto con 65 muestras de controles fértiles. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la morfología y concentración espermática, pero si observaron diferencias en la motilidad espermática así como en la integridad del ADN, evaluado mediante la prueba de naranja de acridina. Contrario a lo publicado por Darin y cols. en Eslovenia (2010) quienes estudiaron 20 parejas infértiles programadas para ICSI, las cónyuges presentaban antecedentes de factor tubario, ovario poliquístico y endometriosis. Ellos analizaron el semen de los hombres encontrando aumento de espermatozoides con elongación de la cabeza (25%), anormalidades de

acrosoma (23%), defectos del núcleo (20,6%) y cabezas amorfas (15.3%). Estas alteraciones relacionadas con la tasa de fertilización mostraron diferencias significativas solo para la cabeza elongada. Los valores mostrados por estos autores difieren de los nuestros, posiblemente debido los criterios morfológicos considerados para clasificar a los espermatozoides.

Estos mismos autores (Darin *et al.*, 2010) analizaron la correlación existente entre la morfología alterada y los niveles de fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL, encontrando un alto porcentaje de espermatozoides con defectos de la cabeza asociados a daño en el ADN. Los defectos en la cabeza del espermatozoide pueden ser considerados como indicador en la fragmentación del ADN

Se ha demostrado que las infecciones seminales causadas por *C. trachomatis* tienen un efecto nocivo para la función de los espermatozoides, particularmente sobre la reacción acrosomal (Jungwirth *et al.*, 2003). La respuesta inflamatoria ante la infección por *C. trachomatis* induce la activación de macrófagos, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y ROS, que se encuentran significativamente elevados, cuando se comparan con los datos obtenidos en los controles sin infección por *C. trachomatis*. En el momento actual existen evidencias suficientes acerca de que los niveles elevados de ROS afectan la reacción acrosomal, estando los espermatozoides normalmente protegidos por el líquido seminal del efecto dañino de ROS (Agarwal *et al.*, 2006; Agarwal y Saleh, 2002).

Las alteraciones de la pieza media presentes en los 70 pacientes incluidos en el estudio, se redujeron considerablemente después del primer ciclo de tratamiento. Esta región del espermatozoide es uno de los sitios que por su naturaleza metabólica es favorito para el desarrollo de la infección por *Mycoplasma sp.* y *C. trachomatis*. Estudios de microscopia electrónica realizados en nuestro laboratorio han descrito la presencia de estas bacterias adheridas y dentro de la pieza media del espermatozoide (Gallegos, 2005).

Nuestras observaciones acerca de la presencia de espermatozoides con gota citoplásmica agrandada coinciden con la demostración de *Mycoplasma sp.* y *C. trachomatis*, infectando la pieza media y el núcleo de los espermatozoides, ésta sería otra posible explicación para la asociación entre la producción de ROS y la presencia de alteraciones estructurales de la cromatina y de gota citoplásmica remanente (Ollero *et al.*, 2001).

Un evento que ocurre normalmente, en los espermatozoides es la hiperactivación la cual requiere de AMPc, cuya producción parece estar modulada por las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que se encuentran el superóxido y el óxido nítrico. El superóxido se origina en el transporte de electrones en la mitocondria y es transformado a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa. Este peróxido activa la adenililciclase de membrana, que actúa corriente arriba en la ruta de PKA, para que ésta fosforile algunas proteínas flagelares. Afectaciones en esta ruta podrían explicar la pérdida de movimiento y la acumulación de ROS en la pieza media del espermatozoide, además de un incremento en el volumen de la pieza media por acumulación de estos productos y el mismo crecimiento de la bacteria (Munire *et al.*, 2004).

Se han publicado múltiples evidencias de que los microorganismos presentes en el líquido seminal interactúan físicamente con los espermatozoides (Svenstrup *et al.*, 2003). Respecto a *M. genitalium*, se ha demostrado que se adhiere a todas las partes del espermatozoide, pero preferentemente al cuello y a la pieza media, y que puede causar aglutinación e inmovilidad de los espermatozoides.

En el caso de *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *E. coli*, se demostró la unión de estas bacterias a la cola, pieza media y cabeza del espermatozoide. Se ha observado que *C. trachomatis* se une a la pieza media de espermatozoides obtenidos de fluido peritoneal, lo que permite suponer que el espermatozoide es capaz de transportar *C. trachomatis* en la pieza media. La adhesión de *M. genitalium* al espermatozoide parece estar mediada por el extremo elongado de la bacteria (Svenstrup *et al.*, 2003).

Como parte del desarrollo de esta tesis evaluamos el resultado de la terapia antibiótica y antioxidante administrada, considerando el logro del embarazo como evento de éxito así como la mejoría en los indicadores seminales de infección, la disminución o eliminación de la infección y la inflamación y en el caso específico de la mujer, los cambios clínicos asociados a la IGU.

Se dio tratamiento y seguimiento clínico a las cónyuges de los pacientes teniendo como resultado que después del tercer ciclo administrado, 27 mujeres lograron el embarazo que evolucionó sin complicaciones y llegó a término favorablemente. Adicionalmente dos pacientes, que no se habían localizado durante la encuesta, y no fueron incluidas en el análisis estadístico, nos comunicaron haber conseguido el embarazo de curso normal que llegó a término sin complicaciones y que se logró en un

período de tres meses después de terminado el tratamiento. En dos parejas que lograron embarazo una vez concluido el tratamiento se produjo una pérdida gestacional en las primeras 6 semanas de gestación. Estos dos casos fueron considerados como fracaso del tratamiento.

La combinación de la terapia antibiótica contra bacterias de la especie *Mycoplasma sp.* y *C. trachomatis* fue indicada en base a los resultados de las pruebas de susceptibilidad aplicadas en los medios de cultivo para Micoplasmas y Ureaplasma. También se tomó en cuenta los antecedentes clínicos de tolerancia y alergias a los antibióticos. Debido a que *C. trachomatis* es una bacteria intracelular y no es metabólicamente activa en la célula huésped, se han considerado como tratamientos efectivos aquéllos que presenten mayor acumulación intracelular del fármaco, para de esta manera combatir efectivamente las infecciones. La mayoría de las guías terapéuticas coinciden en recomendar el empleo de tetraciclinas, macrólidos y las quinolonas como antibióticos de primera elección y en base a eso fueron aplicadas al manejo terapéutico de nuestros pacientes.

Entre las recomendaciones para el tratamiento contra las infecciones de transmisión sexual sugeridas por el CDC desde 1998, se encuentra el uso de azitromicina a dosis de 1g vía oral en dosis única para el tratamiento de *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, en un estudio realizado por Dreses-Werringloer y Cols. en el 2001, se comprobó *in-vitro* el efecto de la azitromicina, encontrando que a la dosis sugerida por organismos internacionales observaban reducción significativa en la infectividad de la bacteria, pero no la eliminación completa de los cuerpos elementales, que se dio hacia el octavo día de tratamiento. Los autores afirmaron que, a pesar de eso, a los 14 días observaron nuevamente la formación de los cuerpos reticulares. Aunque se trató de un estudio *in vitro*, este experimento pone en duda la eficacia del esquema antibiótico recomendado por el CDC. Estos mismos autores (Dreses-Werringloer *et al.*, 2001), usando el mismo modelo experimental comprobaron que esta bacteria tratada con ciprofloxacina y ofloxacina en esquemas internacionalmente sugeridos, las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos y observaron que para la eliminación de estas microorganismos es necesario incrementar la dosis y los tiempos de exposición al tratamiento.

Por nuestra parte en el manejo de los pacientes con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, hemos comprobado que los tratamientos sugeridos por organismos internacionales no logran eliminar los signos y síntomas en el caso de las infecciones

crónicas y que la erradicación de la bacteria no es posible a las dosis y tiempos de uso convencional.

El grupo de pacientes que estudiamos para ésta tesis, fue tratado con 2 y 3 ciclos de antibióticos, de acuerdo a la respuesta clínica, tolerancia a los medicamentos y a la vigilancia de laboratorio. Cada ciclo de tratamiento tuvo una duración de 6 a 7 semanas, combinando un macrólido, una tetraciclina o una quinolona. Dependiendo de la presencia de otros gérmenes de sensibilidad a los antibióticos distinta a la de Clamidias y Micoplasmas, se les indicó a los pacientes, el uso de cefalosporinas y aminoglucósidos en los diferentes ciclos de tratamiento antibiótico asignado.

Los macrólidos actúan inhibiendo la síntesis protéica, esta inhibición no es total ni selectiva, de hecho, algunos de ellos pueden afectar las mitocondrias de las células eucarióticas, lo que significa que la selectividad sólo radica en las diferencias estructurales de los “blancos” ribosomales y en la afinidad de los antimicrobianos hacia tales regiones (Misyurina *et al.*, 2004)

Los tratamientos antibióticos dirigidos a inhibir la síntesis de la membrana, resultan poco efectivos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por Micoplasma y Ureaplasma ya que estas bacterias carecen de pared celular. El uso de antibióticos como los macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas estuvo, por lo tanto, bien indicado en nuestros pacientes como tratamiento contra estas infecciones.

Las pruebas microbiológicas de control aplicadas a nuestros pacientes siguieron detectando la presencia de las bacterias para un número elevado de casos, la prueba de IFD para *C. trachomatis* mostró que un 45% de pacientes presentaban al menos 5 cuerpos elementales en el líquido seminal para las muestras del tercer ciclo de tratamiento y 94% de cultivos positivos para *U. urealyticum* en las muestras del mismo ciclo, aun después de terminado el esquema de tratamiento. Sin embargo la consideración de éxito o fracaso del tratamiento tendría que basarse también en el comportamiento de signos y síntomas, si los hubiera o en los cambios en los parámetros seminales y espermáticos indicativos de la infección. Considerando lo anterior la mejoría del proceso infeccioso en el hombre se vio después del segundo ciclo de tratamiento; conviene también aclarar que aunque no fue un objetivo de éste trabajo el seguimiento clínico de la mujer permitió constatar cambios en las características del sangrado menstrual indicadores de endometritis crónica, el dolor pélvico y la dispareunia desde el término del primer ciclo del tratamiento.

Mediante el examen bacterioscópico en fresco, utilizado para evaluar la concentración de los microorganismos presentes en el líquido seminal, se determinó por igual la eficacia del tratamiento, ya que permitió corroborar una marcada disminución de la concentración de Micoplasmas, hasta en un 70% de los casos, reduciéndose a niveles de concentración calificada como escasa. Para *C. trachomatis* evaluada con la misma técnica, la concentración de cuerpos elementales se redujo hasta en un 80% de los pacientes a una concentración escasa.

Hemos comprobado mediante el uso de estas técnicas que las quinolonas suprimen la generación de cuerpos elementales pero no eliminan al 100% las bacterias, generando episodios de reinfección semanas después de haber presentado el cuadro clínico. Además observamos que con los esquemas de tratamiento aplicados a nuestros pacientes la bacteria no se elimina, pero la concentración de cuerpos elementales y reticulares disminuye al prolongar el tiempo de tratamiento. Las evidencias de laboratorio y los cambios clínicos observados en éste trabajo permiten afirmar que el uso combinado de antibióticos y antioxidantes resultó favorable para la recuperación de la salud reproductiva, mediante la mejoría en los parámetros seminales y en los niveles de fragmentación del ADN.

Mediante algunos ensayos clínicos, se ha comprobado la efectividad de algunos tratamientos antibióticos utilizados para eliminar síntomas clínicos de infección contra *C. trachomatis*, Smelov y Cols (2004), en Rusia, evaluaron el efecto del tratamiento antibiótico de 138 pacientes con sintomatología de uretritis e infección comprobada por *C. trachomatis* mediante cultivo en células de McCoy. Observaron la susceptibilidad de la bacteria a 12 antibióticos y indicando que la azitromicina, rifampicina y la claritromicina eran los más efectivos contra estas infecciones reduciendo casi en su totalidad los síntomas de los pacientes.

Wang y Cols. (2005), evaluaron mediante cultivo en células *HeLa* y McCoy la resistencia antibiótica de *C. trachomatis* en condiciones *in vitro*, concluyeron que estos sistemas son útiles para el conocimiento de la susceptibilidad en los casos donde la respuesta al tratamiento es deficiente, pero una desventaja es que estas bacterias en condiciones *in vivo* no tienen el mismo comportamiento y susceptibilidad antibiótica.

En general, se recomienda el uso de las tetraciclinas, para el tratamiento de las infecciones del tracto genitourinario particularmente en la uretritis no gonocócica y en la enfermedad inflamatoria pélvica, sobre todo cuando los Micoplasmas y Ureaplasmas están implicados en el padecimiento.

En éste trabajo éste antibiótico se administró a dosis de 500 mg dos o tres veces al día, dependiendo de la tolerancia del paciente y de la severidad del cuadro infeccioso, además en las pruebas de sensibilidad antibiótica, la doxiciclina fue uno de los antibióticos que mostró mayor eficacia para el tratamiento de *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Nuestras observaciones coinciden con las publicadas por Solís y Cols. en el 2006, los cuales evaluaron 156 muestras de exudado cérvico vaginal y uretral de una población de Tabasco, en México. El cultivo selectivo permitió aislar y probar la sensibilidad antibiótica para *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, donde la doxiciclina mostró mayor efectividad para el combate de estos microorganismos.

Por otra parte se recomendó el tratamiento con antioxidantes combinados con la terapia antibiótica prescrita. En cada ciclo este tratamiento se extendió por lo menos dos semanas después una vez finalizado el tratamiento con antibiótico. El uso de antioxidantes recomendados para la mejora de la fragmentación del ADN, ha sido ampliamente sugerido por varios grupos. La vitamina E (alfa-tocoferol), la Vitamina C (Ácido Ascórbico), el Ácido Fólico y la Coenzima Q10, fueron indicadas por su efecto antioxidante a los pacientes incluidos en nuestro estudio.

El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante hidrosoluble que actúa como un eliminador de una amplia gama de ROS. Está presente en una concentración diez veces más alta en el plasma seminal en comparación con la sangre y es principalmente secretado por las vesículas seminales (8). El ácido ascórbico actúa como donador de electrones de gran alcance que reacciona con los radicales superóxido, peróxido de hidrogeno e hidroxilo para formar ácido dehidroascórbico.

En la evaluación del tratamiento antibiótico y antioxidante encontramos, que el líquido seminal de los pacientes con embarazo, presentó cifras mayores para la concentración, la motilidad, la vitalidad y el porcentaje de espermatozoide de forma normal. Las cifras indicativas de esta mejoría fueron estadísticamente significativas, una vez terminado el segundo ciclo de tratamiento para el grupo de pacientes que logró embarazo. Por el contrario en los pacientes que no reportaron embarazo, los parámetros espermáticos referidos permanecieron afectados.

Estas observaciones coinciden con las reportadas por Kobayashi y Cols. (1991), los cuales demostraron que niveles elevados de ROS y fragmentación del ADN, se relacionan con mayor grado de alteración en la motilidad espermática. Contrario a lo reportado por Suleiman *et al.*, (1996), quienes no encontraron relación entre las

concentraciones altas de ROS y la disminución en la motilidad y la concentración de espermatozoides.

Das y Cols. en el 2009, encontraron una relación directa entre la concentración de malonaldehído y la presencia. Estos autores sugieren que como parte del manejo del paciente con alteraciones en parámetros seminales se administre ácido ascórbico y vitamina E.

En nuestro estudio demostramos mediante la técnica de citología en fresco que la concentración bacteriana se redujo al 50%, por lo que el daño debido a la presencia de los productos radicales libres, productos del metabolismo bacteriano, la presencia de leucocitos y la consecuente producción de ROS, en conjunto, se vio disminuido. La terapia combinada de antibiótico y antioxidante se reflejó en la recuperación de los parámetros seminales.

Respecto al uso de antioxidantes nuestras observaciones corroboran los resultados de May en 1996 y Greco en el 2005, quienes sugirieron el efecto preventivo de la lipoperoxidación de la membrana por los antioxidantes.

Los rasgos citológicos asociados a la inflamación se redujeron considerablemente, en los pacientes que lograron el embarazo, en los que las cifras de leucocitos y macrófagos fueron inferiores significativamente comparándolas con las del grupo que no consiguieron embarazo.

La disminución en estas células se asoció a frecuencias bajas de espermatozoides con ADN fragmentado como resultado de la disminución de ROS (producido por células inflamatorias y por las bacterias). Estos resultados pudieran ser clave en la recuperación de la fertilidad, producto de una mejora general en los parámetros seminales y en la fragmentación del ADN.

Respecto de la relación de la producción de ROS y la fragmentación cromatínica coinciden con los resultados de algunas publicaciones, como la de Das y Cols. (2009), quienes midieron la concentración de ROS y Ácido ascórbico en el plasma seminal de pacientes infértiles encontrando niveles mayores de ROS y niveles bajos de Ácido ascórbico en pacientes, existiendo un desequilibrio bioquímico que trae como consecuencia deterioro de los parámetros seminales (Das, 2009).

Defectos de la morfología espermática con aumento de espermatozoides, piriformes, binucleados, núcleos decondensados, núcleos vacuolados, elongados y defectos del acrosoma, fueron las anomalías más frecuentes para el grupo de pacientes sin embarazo. Este patrón de morfología alterada puede estar asociado con infección

intraespermática por *C. trachomatis* y con la presencia de bacterias observadas en la superficie del espermatozoide. Otro hallazgo adicional fue que este patrón de alteración morfológica estaba asociado con incremento en los niveles de fragmentación del ADN reportada en el grupo de pacientes sin embarazo.

Se sabe que en las infecciones de la vía espermática con participación de *Mycoplasma sp.*, las concentraciones de H₂O₂ se encuentran elevadas y cursan con niveles altos de ROS (Agarwal y Prabakaran, 2005). Nosotros contrarrestamos este incremento usando terapia antioxidante con ácido ascórbico y vitamina E, que actúan como protectores de los espermatozoides contra el daño al ADN. Estos resultados coinciden con los publicados por Greco y Cols. (2005), los cuales estudiaron en 64 hombres infértiles el efecto de la vitamina C y E, observando cambios en la concentración, morfología y motilidad espermática asociadas también a disminución de los niveles de espermatozoides fragmentados.

Hasta nuestro conocimiento éste es el primer estudio en pacientes infértiles en el que se describe el efecto de la combinación de terapia antioxidante y antibiótica, para resolver la presencia de infección seminal, al mismo tiempo que se intenta mejorar la calidad espermática y particularmente el daño de la cromatina de los espermatozoides. Otros investigadores han referido el efecto benéfico de los antioxidantes en la recuperación del daño cromatínico y de la calidad espermática, pero este es el primer estudio con seguimiento de pacientes hasta la verificación del resultado sobre la recuperación de la fertilidad y la prevención de complicaciones obstétricas relacionadas con la coinfección genital por Clamidia y Micoplasma.

El resultado del tratamiento antibiótico y antioxidante sobre la concentración de estas bacterias y la recuperación de la calidad de los espermatozoides, de acuerdo a nuestras observaciones, es consistente y se refleja en la recuperación del potencial de fertilidad de los pacientes, prácticamente en la mitad de las parejas a los que se les pudo dar seguimiento.

Los resultados clínicos y de laboratorio obtenidos en este estudio fueron analizados mediante el modelo multivariante de cox con la finalidad de predecir el embarazo en base a las características y cambios que sufrieron durante el tratamiento. Solo dos parámetros seminales se relacionaron con el logro del embarazo y fueron: la concentración de bacterias presentes en las muestras y sus fluctuaciones entre el segundo y tercer ciclo de tratamiento antibiótico y antioxidante. Se sabe que, la presencia y concentración elevada de bacterias en el líquido seminal, afectan

directamente a los espermatozoides por medio de la vía de la sobreproducción de ROS (Aitken, 1994; Lopes 1998; Fernandez *et al.*, 2005).

El otro parámetro seminal relacionado con el logro del embarazo fue la presencia de defectos de la cabeza del espermatozoide, su incremento fue significativo para el modelo de predicción de Cox, indicando que al aumentar esta anomalía morfológica la probabilidad de embarazo se reduciría hasta en 11% en base a la tasa de aumento reportada en nuestros pacientes después de los tres ciclos de tratamiento.

El modelo multivariante, con dos variables independientes, creado con nuestra muestra no ha podido compararse con otros, dado que no hemos encontrado ninguna propuesta de modelo multivariante en la literatura que se aplique al problema de la presente tesis.

En nuestro estudio no consideramos discernir la medida en que influyeron los antibióticos y en que otra los antioxidantes, sin embargo, el tratamiento combinado originó un control del proceso infeccioso e inflamatorio, con una mejoría en la calidad espermática que se relacionó con la recuperación de la fertilidad.

Consideramos que los resultados contradictorios reportados hasta ahora por otros autores, acerca del impacto que el daño cromatínico de los espermatozoides tiene en la fertilidad, pueden tener varias explicaciones, pero uno de los principales aspectos para la comprensión de éste factor etiopatogénico de la subfertilidad masculina, es la falta de estudios que en paralelo indaguen y resuelvan la patología infectoinmune del microambiente femenino en el que sucede la fecundación y el desarrollo embrionario y fetal.

El estudio del binomio andro-ginecológico como unidad de diagnóstico, tratamiento y pronóstico, debe mantenerse como piedra angular para la resolución de los problemas de fertilidad, y esto es válido desde el nivel de organización social, como anatómico, tisular, subcelular y molecular.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

PRIMERA. Se confirmó que las infecciones ocasionadas por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* producen alteración de los parámetros físicoquímicos y citológicos, del líquido seminal disminuyendo la concentración, motilidad, vitalidad los cuales se relacionaron con un aumento en los niveles de fragmentación de la cromatina del espermatozoide.

SEGUNDA. Después de 12 semanas de tratamiento antibiótico y antioxidante dirigido a combatir las infecciones por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, se observaron cambios favorables y estadísticamente significativos en los niveles de fragmentación de la cromatina espermática.

TERCERA. El tratamiento antibiótico y antioxidante administrado a pacientes con IGU por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, se asoció significativamente a la reducción de la bacteriospermia, disminución de la concentración de leucocitos y menor presencia de restos celulares como parámetros citológicos asociados a la inflamación.

CUARTA. El daño ocasionado por Chlamydia y Mycoplasma en la morfología de la cabeza, del núcleo, del acrosoma, de la pieza media y en el flagelo del espermatozoide, se relacionan con el incremento en los niveles de fragmentación de la cromatina del espermatozoide de los pacientes infértiles.

QUINTA. La disminución en los defectos de la cabeza del espermatozoide y en los niveles de daño del ADN espermático, y en la bacteriospermia son factores de pronóstico favorable para el embarazo en los pacientes que fueron tratados con antibióticos y antioxidantes contra infecciones por Chlamydia y Mycoplasma.

SEXTA. El uso combinado de antibióticos y antioxidantes resultó favorable para la recuperación de la salud reproductiva en casi el 50% de los pacientes de este estudio lo cual asocio al control de la infección, al incremento en los niveles de fragmentación del ADN y a la recuperación de la calidad espermática.

RESUMEN

8. RESUMEN

Estudios previos en población de la región noreste de México, demostraron que un porcentaje alto de pacientes con diagnóstico de infertilidad de causa no conocida, padecen infección de genital interna por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* A pesar de ser subclínicas, estas infecciones implican la presencia de bacteriospermia y leucocitospermia, repercutiendo sobre la calidad seminal y espermática, pero los mecanismos implícitos en ésta patología no están del todo dilucidados. Nuestra línea de investigación se ha enfocado en los últimos años al análisis del daño subcelular y molecular de los espermatozoides expuestos a la coinfección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

En la última década se ha reconocido la influencia negativa de los ROS sobre la integridad de la membrana plasmática, la función mitocondrial y la fragmentación del ADN. En el caso de los espermatozoides, estos daños pudieran explicar la disminución de su capacidad de fecundación.

El propósito de éste trabajo fue aportar evidencias acerca de los mecanismos de lesión espermática, en presencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* y analizar el efecto del tratamiento combinado con antibióticos y antioxidantes. Para ello comparamos el comportamiento de los principales parámetros seminales y espermáticos, particularmente los niveles de fragmentación de la cromatina del espermatozoide, antes y después de tratamientos en los que se combinaron antibióticos específicos para *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* y antioxidantes.

Tomando como evento de éxito el que después del tratamiento los pacientes tuvieran un embarazo que llegara a término sin complicaciones, realizamos un análisis de supervivencia con la finalidad de identificar indicadores de valor predictivo.

Estudiamos 70 pacientes infértiles con infección seminal por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* y 28 hombres sanos fértiles como grupo control. Entre los parámetros espermáticos que se relacionaron en forma significativa con la infección se encontraron el porcentaje de espermatozoides de forma anormal y la dispersión anormal de la cromatina del espermatozoide ($p < 0,0001$). El tratamiento combinado de antibióticos y antioxidantes se reflejó en incremento de la calidad espermática y disminución de la concentración de bacterias. En los pacientes en los que el embarazo

se dio después del tratamiento, la calidad espermática fue mejor comparada con los que no lo obtuvieron. Los parámetros que se modificaron en un grado que en la comparación resultó ser estadísticamente significativo fueron: el movimiento progresivo rectilíneo ($p<0,028$), el porcentaje de espermatozoides con pieza media alterada ($p<0,008$), las lesiones acrosomales: acrosoma pequeño ($p<0,007$) y vacuolado ($p>0,0001$) y el patrón de dispersión cromática de halo grande ($p<0,008$).

Este es el primer estudio que se enfoca a la coinfección genitourinaria por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, como causa importante en el deterioro del contenido genético de los espermatozoides y que analiza el efecto del tratamiento antibiótico y antioxidante combinado. La mejoría observada en parámetros de calidad espermática y control de la infección se asoció a la consecución de embarazo en casi la mitad de los pacientes.

El halo de dispersión grande, la integridad del acrosoma y la normalidad de la pieza media del espermatozoide resultaron parámetros de valor predictivo para el logro del embarazo en pacientes con infección por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* tratados simultáneamente con sus cónyuges a base de antibióticos de acción específica para esos gérmenes y antioxidantes reductores de los niveles de ROS.

SUMMARY

9. SUMMARY

Previous studies in the population of the northeastern region of Mexico, demonstrated that a high percentage of patients with a diagnosis of infertility with unknown etiology, suffer of an internal genital infection by *C. trachomatis* and *Mycoplasma sp.* Even though they are subclinical, these infections imply the existence of bacteriospermia and leucocytespermia, affecting the quality of seminal and spermatic samples, but the implicit mechanisms in this pathology are not dilucidated.

Our line of investigation in the last few years has been focused to the analysis of subcelular damage of the spermatozoa exposed to the coinfection by *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* In the last decade it has been recognized the negative influence of the ROS in the integrity of the plasmatic membrane, the mitochondrial function and the fragmentation of DNA. In the case of the spermatozoa, these damages could explain the diminishing of their fecundation capacity.

The aim of this work was to obtain evidence of the mechanisms of spermatic damage associated to infection by *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* and to analyze the effect of a combined treatment with antibiotics and antioxidants. For this we compared the behavior of the most important seminal and spermatic parameters, in particular the fragmentation levels of the sperm chromatin, before and after the treatments in which we combined specific antibiotics for *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* and antioxidants. Considering as a successful event, a pregnancy without any complications, achieved after this treatments, we did a survival analysis to identify spermatic or seminal parameters of a predictive value.

We studied 70 infertile patients with seminal co infection by *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* and 28 healthy and fertile men as a control group. Between the spermatic parameters that were significantly related with the infection we found a high percentage of abnormal spermatozoa and the abnormal pattern of chromatin dispersion ($p < 0,0001$). The combined treatment of antibiotics and antioxidants were associated to an increase of sperm quality and diminishing of bacteria concentration. In the patients where the pregnancy was achieved after treatment, the spermatic quality was much better compared with patients that not had pregnancy. The most important parameters modified after the treatment, due to their statistical significance were: the progressive linear movement ($p < 0,028$), the spermatozoa percentage with altered medium piece

($p < 0,008$), the acrosomal injuries: small ($p < 0,007$) and vacuolated acrosome ($p > 0,0001$) and the chromatinic dispersion pattern of big halo ($p < 0,008$).

This is the first study which focused in the genitourinary co infection by *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, as an important cause of the detriment of the genetic content of the sperm and analyzes the effect of the antibiotic and antioxidant treatment. The observed improvement in the spermatic quality parameters and the infection control, was associated to the pregnancy in almost half the patients.

The big dispersion halo, the acrosome integrity and the normality in the middle piece of the sperm, resulted of predictive value for the achievement of the pregnancy in patients with *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.* co infections treated simultaneously with antibiotics of specific action for the germs, and antioxidants that reduce the ROS levels.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abdel-Rahman Y, Belland R. The chlamydial developmental cycle. *Microbiol Rev* 2005; 29:949–959
- Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol* 2004;56:235-45.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18:325–332.
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Ind J Exp Biol* 2005; 43: 963-74.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331-45
- Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29:817-827.
- Agarwal A., Said T. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2004;95:503-507
- Aitken RJ, Baker MA. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans. *Hum Reprod* 1995; 10:1736-1739.
- Aitken RJ, Fisher H, Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 1994; 16: 259-267
- Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004;432:48-52
- Aitken RJ, Krausz C., Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122:497-506.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108:2017–25.
- Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of Chlamydia pneumonia TWAR infection in Seattle families 1966-1979. *J Infect Dis* 1992; 166:646-649.
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ Jr, et al. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78:319 –29.
- Álvarez-Cuevas, S; Ramos-González, B; Ancer, J; Gallegos, MG. Lipoperoxidation level in seminal fluid from infertile men with Chlamydia trachomatis and Mycoplasma spp genital infection and its correlation with DNA damage and apoptosis). *Int. J. Morphol* 2008;26:227-236.
- Andrade FT: Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 2003; 71: 377 – 381.
- Baehr W, Zhang Y, Josep T, Su H, Nano FE, Evertt DE, et al. Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85:4000-4004
- Ball BA, Baumber J, Sabeur K . Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenol* 2002; 58: 299-300
- Baron S. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX), The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996; Cap 37
- Bauman R. Microbiology; with diseases by taxonomy; 2nd ed. San Francisco: Pearson/ Benjamin Cummings, 2007: 778 pp
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl*. 2000;21: 895-902
- Bavoil P. Invasion and Intracellular Growth of Chlamydia Species. In: Iglewski BH, Clark VL. Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. San Diego, CA .Academic Press INC, 1990; 273-296.
- Bébéar CM, Kempf. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. In A. Blanchard and G. F. Browning. Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control, in press. Wymondham UK, Horizon Bioscience, 2005; 535-568.
- Bébéar CM. Pathogenesis and laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections. *Arch Pediatr* 2008; 15:1253-1256.
- Beeton ML, Chalker VJ, Maxwell NC, Kotecha S, Spiller OB. Concurrent titration and determination of antibiotic resistance in Ureaplasma species with identification of novel point mutations in genes associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2020-2027.
- Belland RJ, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell

- HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. PNAS 2003; 100:8478-8483
- Bhattacharya SM. Association of various sperm parameters with unexplained repeated early pregnancy loss—which is most important? Int Urol Nephrol (2008) 40:391–395
- Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of *Ureaplasma* respiratory tract infections in newborns. Acta Biochimica Polonica 2006; 53:609–612.
- Blanchard A. *Ureaplasma urealyticum* rease genes; use of a UGA tryptophan codon. Molec Microbiol 1990; 4:669-676
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet, 352, 1172
- Bragina EY, Gomberg MA, Dmitriev GA. Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment. J Eur Acad Dermatol Venereol 2001; 15:405-409.
- Breeze AC. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 6th edn Edited by Jack S Remington, Jerome O Klein, Christopher B Wilson, Carol J Baker. Published by Elsevier, Amsterdam, 2006, pp 1313.
- Bruce AW, Chadwick P, Willett WS, O'Shaughnessy M. The role of *Chlamydia* in genitourinary disease. J Urol 1981; 126:625-629.
- Bt KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 1999; 49:415–440
- Buchholz KR, Stephens RS. The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following *Chlamydia trachomatis* infection. Infected immune 2007; 75:5924-5929.
- Bush RM, Everett KD. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51:203–220.
- Camejo M, Mata G, Díaz M. Alteraciones en la citología cervical y respuesta inmune contra *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales. Inv Clin. 2003; 44(4):319-326
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:1-27.
- Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Disease Surveillance. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, November 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002.MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002/51 (RR15): 1-27.
- Chacko MR, Wiemann CM, Smith PB. *Chlamydia* and gonorrhea screening in asymptomatic young women. J Pediatr Adolesc Gynecol 2004; 17:169-178.
- Chalker VJ. Canine Mycoplasmas. Res Vet Sci 2005; 79:1-8
- Chan PT, Schlegel PN. Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. J Androl 2002; 23:453-460
- Cheah F, Anderson TP, Darlow BA, Wang H. Comparison of the Mycoplasma Duo test with PCR for detection of *Ureaplasma* species in endotracheal aspirates from premature infants. J Clin Microbiol 2005; 43:509–510.
- Chemes HE, Olmedo SB, Carrera C, Osés R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. Hum Reprod 1998; 13:2521-2526
- Claman P, Amimi MN, Peeling RW. Toye B, Jessamine P. Does serologic evidence of remote *Chlamydia trachomatis* infection and its heat shock protein (CHSP 60) affect in vitro fertilization embryo transfer outcome? Fertil Steril 1996; 65:146-149.
- Cocchiari JL, Valdivia RH. New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. Cellular Microbiology 2009; 11:1571–1578
- Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, Astete S, Brunham RC, Holmes KK, Sinei, Bwayo JJ Totten PA. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. Lancet 2002; 359:765-766.
- Colpi GM, Negri L, Piffaretti-Yannez A, Balerna M. Inflammatory pathology of the genital tract and male infertility. A short review. Acta Eur Fétil 1989; 20:125-132.

- Cordova CMM, Blanchard A, Cunha RAF. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in Human Immunodeficiency virus – positive patients as compared to patients with other sexually transmitted diseases. *J Clin Lab Anal* 2000; 14:246–253.
- Crosignani PG, Rubin BL. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod* 2000; 15:723–732.
- Cunningham K, Beagley K. Male Genital Tract Chlamydial Infection: Implications for Pathology and Infertility. *Biol Reprod* 2008; 79:180-189
- Dale AW, Wilson JD, Forster GE, Daniels D, Brook MG. Management of epididymo-orchitis in genitourinary medicine clinics in the United Kingdom's North Thames region 2000. *Int J STD AIDS* 2001; 12:342-345.
- Dancer SJ, Robb A, Crawford A, Morrison D. Oral streptogramins in the management of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections, *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:731-735.
- Darin B, Goropevnek A, Hojnik N., Vlaisavljević V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281:363–367
- Das P, Choudhari AR, Dhawan A and Singh R. Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2009 / 24 (3)
- Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol* 2005; 7:1714-1722.
- Dawson EB, Harris WA, Teter M, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992; 58: 1034-1039.
- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumonia* infection. *Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 9:263–273.
- De Borges RJ, Carvalho I. Ultraestructura de Chlamydia en células descamadas del cuello. *IDEA* 1987; 25:257-264.
- De Louvois J, Belder M, Harrison RF, Hurley R, Stanley VC. Frequency of *Mycoplasma* in fertile and infertile couples. *Lancet* 1974; 303: 1073-1075
- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping. *J Infect Dis* 2000; 182:909–916.
- Den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, Land JA, Evers JL, Kessels AG. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2008; 23:1840–1848.
- Department of health and human services Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010; 59
- Dessus-Babus S, Bebear CM, Charron A, Bebear C, de Barbeyrac B. Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of Chlamydia trachomatis and characterization of quinolone-resistant mutants obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2474–2481.
- Díaz-García FJ, Herrera-Mendoza AP, Guerra-Infante FM. Attachment and intracellular location of *Mycoplasma hominis* on in vitro-infected human sperm cells. 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (L-1065, abstract) 2003, pp. 418
- Díaz-Gutiérrez OG, Gallegos AG. Ureaplasma urealyticum diagnosis by PCR in infertile men and its clinical relevance. *J Androl* 1999; 20:38.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol* 2000; 10:39-44.
- Dienes L, Edsall J. Observations on the L-organism of Kleinberger. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937; 36:740-746.
- Dohle GR. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* 2003; 35:321.
- Dreeses-Werringloer U, Padubrin I, Köhler L, Hudson AP. Detection of nucleotide variability in rpoB in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of Chlamydia trachomatis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2316–2318.
- Dreeses-Werringloer U, Padubrin I, Zeidler H, and Lars Köhler L. Effects of Azithromycin and Rifampin on Chlamydia trachomatis Infection In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3001–8.
- Duffy LB, Waites K. Mycoplasma Techniques Workshop Manual, In 17th International Organization for Mycoplasma Congress, Tianjin Medical University, China, 2008.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kunt B, Meyer A, Wondra J, Strowitzki T, Petzoldt D. Prevalence of Chlamydia trachomatis in subfertile couples. *Fertil Steril* 2003; 80:660–663.

- Eikman MR, Leinonen M, Sirjälä H, Linnanmäki E, Kujala P, Saikku P. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* during an epidemic in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:756-760.
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod* 2005;20:2601-7
- Eliopoulos GM. Antimicrobial agents and chemotherapy. Washington, DC. American Society for Microbiology, 2001; 45:3001-3008
- Enrique-Laval R. La enfermedad de las cotorras infecciosas. *Rev Chil Infect* 2003; 20:37-38
- Erbengi T. Ultrastructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa. *Hum Reprod* 1993; 8:416-421.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwerzman A. Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and Clinical Aspects. *Asian J Androl*. 2006;8:11-29
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 49 (Pt 2), 415-440
- Fagundo R. Chlamydia. Actualización de entidades patológicas y pruebas diagnósticas. *Rev Mex Patol Clin* 2000; 47:242-244
- Falsey AR, Walsh EE. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* in young children in a Japanese family. *J Infect Dis* 1990; 162:1390-1392.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2005; 84: 833-842.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C. Halosperm® is an easy, available and cost-effective alternative to determine sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005; 84: 860.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG.: The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003; 24: 59-66
- Forbes BA, Bartholoma N, McMillan J, Roefaro MA, Weiner L, Welych L. Evaluation of a monoclonal antibody test to detect *Chlamydia* in cervical and urethral specimens. *J Clin Microbiol* 1986; 23:1136-1137.
- Ford CA, Viadro CI, Miller WC. Testing for Chlamydial and gonorrheal infections outside of clinic settings. A summary of the literature. *Sex Transm Dis* 2004; 31:38
- Fowlkes DM, Dooher GB, O'Leary WM. Evidence of scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and *T. mycoplasmas* in men of infertile marriage. *Fertil Steril* 1975; 26:1203-1211.
- Fraser CM, Gocayne JD, White O, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 1995; 270:397-403.
- Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril* 2008; 90:328-334.
- Gallegos M. G., Ramos-González B.; Ancer-Rodríguez J. Patrón de alteraciones de la ultraestructura espermática en hombres infértiles con infección seminal por *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Horizontes de la Medicina y XXIV Congreso nacional de Investigación Biomédica. Monterrey N.L. México. Agosto de 2007.
- Gallegos MG. Estudio citológico del semen de hombres subfértiles con infección genital por *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Observaciones en cortes semifinos y ultrafinos. Doctor en Medicina, Madrid, Universidad Autónoma de Madrid, 2005 pp160
- Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Alvarez-Cuevas S, Ramos-Gonzalez B, Sanchez-Hernandez J, Nistal M, Regadera-Gonzalez J. Relevancy of semithin sections on the analysis of seminal damage, due to infection by *Chlamydia* and *Mycoplasma*, in couples with unsuccessful assisted reproduction. Ed. Medimont International. Bologna, Italy, 2009, pp: 123-128.
- Gallegos-Avila G, Ortega-Martínez M, Ramos-González B, Tijerina-Menchaca R, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G. Ultrastructural findings in semen samples of infertile men infected with *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasmas*. *Fertil Steril*. 2009; 91(3):915-9
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in

- human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15: 830±839.
- Garcia H, Pérezares J, Castrijon L, Aceves P, Lobato E. El tracoma. *AMSE* 2008; 21:1-7
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sallemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium in semen and first-void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 2007; 29:198–206.
- Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect Dis* 2007; 7:129.
- Gdoura R, Keskes-Ammar L, Bouzid F, Eb F, Hammami A, Orfila J. Chlamydia trachomatis and male infertility in Tunisia. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2001; 6:102-107.
- Gil C, Rivera A, Bañuelos D, Salinas S, García-Latorre E, Cedillo L. Presence of Mycoplasma fermentans in the blood stream of Mexican patients with rheumatoid arthritis and IgM and IgG antibodies against whole microorganism. *BMC Musculoskelet Disord*.2009; 10:97.
- Gnarpe H, Friberg J. Mycoplasma and human reproductive failure. The occurrence of different Mycoplasma in couples with reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114:727-731
- Golden MR, Schillinger JA, Markowitz L. Duration of untreated genital infections with Chlamydia trachomatis: a review of the literature. *Sex Trans Dis* 2000; 27: 329 – 37.
- Gonzales CF, Kortebani G, Mazzolli AB. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch Androl* 1993; 30: 63-68
- Gonzales CF, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 1992; 57: 1058-65
- González GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Ávila G, Díaz-Gutiérrez O, et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male infertility. *Andrologia* 2004; 36:1-23.
- Gorga, F, Galdiero, M, Buommino, E, Galdiero, E. Porins and Lipopolysaccharide Induce Apoptosis in Human Spermatozoa. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 206–208.
- Gorpinchenko II, Dobrovol'skaia LI. Chlamydia infection in patients with inflammatory diseases of the genital. *Lk Sprava* 1997; 4:99-104.
- Goydos C, Maldeis NE, Hardick A, Quinn TC. Mycoplasma genitalium as contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 2009; 36:598-606.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik S. Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *J of Andrology*, Vol. 26, No. 3, May/June 2005
- Guerra-Infante F.,Tapia-Yáñez JR., López-Hurtado M.,Flores-Medina S., Díaz-García F. Infección por Chlamydia trachomatis en varones y su asociación con las alteraciones ginecológicas de su compañera sexual. *Rev invest Clín* 2005;57:406-414
- Halberstaedter L, von Prowazek S. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*. (Berlin, Deutschland) 1907; 26:44-7.
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005;83:635-42
- Herring AJ. Typing Chlamydia psittaci-a review of methods and recent findings. *Br Vet J* 1993; 149,455-475.
- Hicks, J.J. Bioquímica. McGraw-Hill. México. 2001; 900 pp.
- Holmes KK, Sparling PF, Mardh P-A. Sexually Transmitted Diseases, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, 1999, Chapter 6, ISBN 0-07-029688-X.
- Holmes RP, Goodman HO, Shihabi ZK, Jarow JP. The taurine and hypotaurine content of human semen. *J Androl*. 1992;13:289–92.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrin* 2003;1:107
- Hori S, Tsutsumi Y. Histological differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis: nondestructive and proliferative versus destructive and abscess forming-immunohistochemical and clinicopathological findings. *Hum Pathol* 1995; 26:402-407.
- Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, Naido RO, Taylor –Robinson D. Association of Mycoplasma genitalium with acute non-

- gonococcal urethritis. *Lancet* 1993; 342:582-585.
- Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA. Co-incubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod* 2001; 16:293-299.
- Hosseinzadeh S, Eley A, Pacey AA. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl* 2004; 25:104-109.
- Howell MR, Quinn TC, Brathwaite W, Gaydos CA. Screening women for *Chlamydia trachomatis* in family planning clinics: the cost-effectiveness of DNA amplification assays. *Sex Transm Dis* 1998; 25:108-117.
- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS.: Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2005;84:130-40
- Ibrahim AA, Refeidi A, El Mekki AA. Etiology and clinical features of acute epididymo-orchitis. *Ann Saudi Med* 1996; 16:171-174.
- Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson J I. Demonstration of *Chlamydia trachomatis* IgG Antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduce likelihood of achieving pregnancy. *Hum Reprod* 2004; 19: 1121-1122.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 2001 64: 674-683
- Jakiel G, Robak-Cholubek D, Wiczorek P, Bokinić M. Evaluation of some parameters of human semen with positive chlamydial reaction. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med]* 2004; 59:61-64.
- Jansen JS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18:1-11
- Jawetz E. *Microbiología Médica*. 15ª ed. México, D.F., Manual Moderno, 1996; Cap 26, 28: 349-354, 363-374
- Jungwirth A, Straberger B, Esterbauer K, Fink K, Schmeller N. Acrosome reaction in *Chlamydia*-positive and negative patients. *Andrologia* 2003; 35:314-316.
- Katz BP, Fortenberry D, Orr D. Factors affecting chlamydial persistence or recurrence one and three months after treatment. In: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al., editors. *Chlamydia Infections: Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Infection*, Napa, Berkeley, CA: Berkeley University Press, 1998. p. 35-8.
- Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998; 4:891-903.
- Khan MA, Potter CW, Sharrard RM. A reverse transcriptase-PCR based assay for in-vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37:677-85.
- Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. *APMIS* 1997; 105:566-570.
- Knight ST, Lee SH, Davis CH, Moorman DR, Hodinka RL, Wyrick PB. In-vitro activity of nonoxynol-9 on McCoy cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis* 1987; 14:165-173.
- Kobayashi T, Jinno M, Sugimura K, Nozaya S, Sugiyama T, Lida E. Sperm morphological assessment based on strict criteria and in vitro fertilization outcome. *Hum Reprod* 1991; 6: 983-6.
- Köhn FM, Erdmann I, Oeda T, El Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB. Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia* 1998; 30:73-80.
- Kong F, G.L. Gilbert. Postgenomic taxonomy of human *Ureaplasmas* – a case study based on multiple gene sequences. *International J Syst Evolution Microbiol* 2004; 54:1815-1821.
- Krause W, Bohring C. Male infertility and genital chlamydial infection: victim or perpetrator? *Andrologia* 2003; 35:209-216.
- Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Atlanta, GA. Springer, 2010 ;Vol. 4
- Krieger JN, Riley DE. Bacteria in the chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome molecular approaches to critical research questions. *J Urol* 2002; 167:2574-2583
- Kundsin RB. *Mycoplasmas in humans: significance of Ureaplasma urealyticum*. *Health Lab Sci* 1976; 13:144-151.
- Kuo CC, Jackson L, Campbell L, Grayston T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:451-61.

- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aarnold ET and Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. 2003 *Fertil Steril* 80, 895–902
- Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67: 142-147.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003; 79:212-215.
- Leyva MA, Rodríguez MA, Martínez NE, Antonio V, Alarcón LC, Flores E. Chlamydia trachomatis en sexoservidoras del estado de Guerrero. XXII Congreso Nacional de Química Clínica 1999; MSTL 21.5.
- Liu RZ, Gao JC, Zhang HG, Wang RX, Zhang ZH, Liu XY. Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. *J Ind Med Res* 2010; 38: 923-8
- Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, McLaughlin EA, Al-Sufyan H, Maile LA, Joels LA, Hull MG. Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in in-vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. *Hum Reprod* 1996; 11:1227-1231.
- Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Minireview: Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4915–4923.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998; 13: 896-900.
- Mandell G L. Enfermedades Infecciosas. Tomo II. p. 1519. Ed. Médica Panamericana. Bs. Aires. Rep. Argentina. 1991
- Mandell, Douglas, Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 1994; Vol.1 and 2:2804 p.
- Mandell, Douglas, Bennett's. Principles and practice of infectious diseases.. 4th edition. Volumes 1 and 2: 1995 pp. xxix + 1312pp.;xxxix + 1490 pp..
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. 1995;52:864-7
- Maniloff J, McElhaney RN, Finch L, Baseman JB. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Washington DC, American Society for Microbiology, 1992; 2,25,33:23-40,417-444,549-560.
- Marshall AJ, Miles RJ, Richards L. The phagocytosis of Mycoplasmas. *J Med Microbiol* 1995; 43:239–250.
- Martínez M. Microbiological diagnosis of Chlamydia trachomatis: state of the problem. *Rev. Chil. Infectol* 2001; 18:275-284.
- Martínez MA, Diomedi A, Kogan R, Borie C. Taxonomía e importancia clínica de las nuevas familias del orden Chlamydiales. *Rev Clin Infectol* 2001; 18:203-211.
- Martínez T. Microbiological diagnosis of sexually transmitted infections (STI). Non-viral STI *Rev Chil Infectol* 2009; 26:529-539.
- May JM, Qu ZC, Whitesell RR, Cobb CE. Ascorbate recycling in human erythrocytes: Role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Rad Biol Med* 1996;20:543–547.
- May JM. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J*. 1999;13:995-1006.
- McDonough EA, Barrozo CP, Russell KL, Metzgar D. A multiplex PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Bordetella pertussis in clinical specimens. *Molec Cell Probes* 2005; 19:314–322.
- Membrillo A, Córdova A, Hicks JJ, Olivares IM, Martínez VM, Valencia JJ. Peroxidación Lipídica y Antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia* 2003; 28: 699-704
- Menkveld R, Holleboom C, Rhemrev J. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl* 2011; 13:59-68
- Meseguer MA, Martínez-Ferrer M, De Rafael L, Galvez M, Baquero F. Differential counts of Ureaplasma urealyticum in male urologic patients. *J Infect Dis* 1984; 149:657-658.
- Miles RJ. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. *Cell Nutrition and Growth*. 1992; 23
- Misyurina OY, Chipitsyna EV, Finashutina YP, et al. Mutations in a 23S rRNA gene of Chlamydia trachomatis associated with resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1347–1349.

- Moller BR. Demonstration of Chlamydial inclusions in exfoliated cells. *Scand J Infect Dis* 1982; 32:16-20.
- Morales R, Lledó B, Ortiz José A, Rodríguez-Arnedo Doril, Fabregat A, Bernabeu R. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 2007;24:305-313
- Moretti E, Capitani S, Figura N. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:47 – 56
- Morré SA and Peña AS. An integrated approach to the understanding of Chlamydia infections: introduction to the 2009 update. *Drugs of Today* 2009; 45:3-5
- Morré SA, Rozendaal L, van Valkengoed IG, Boeke AJ, Van Voorst Vader PC, Schirm J, De Blok S, Van Den Hoek JA, Van Doornum GJ, Meijer CJ, Van Den Brule AJ. Urogenital Chlamydia trachomatis Serovars in Men and Women with a Symptomatic or Asymptomatic Infection: an Association with Clinical Manifestations? *J Clin Microbiol* 2000; 38:2292-6.
- Munday PE, Thomas BJ, Gilroy CB, Gilchrist C, Taylor-Robinson D. Infrequent detection of Chlamydia trachomatis in a longitudinal study of women with treated cervical infection. *Genitourin Med* 1995; 71:24–26.
- Munire M, et al. Impaired hyperactivation of human sperm in patients with infertility. *J Med Dent Sci*. 2004; 51:99-104
- Nagler, H.M. Infertilidad Masculina: Conceptos y controversias actuales. *Clínicas Urológicas de Norteamérica*. España, Elsevier Masson, 2008; 35
- Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, Matsumiya K, Okuyama A. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol*. 2001;8:49-52.
- Nelson S, Matlow A, Johnson G, Th'ng C, Dunn M, Quinn P. Detection of Ureaplasma urealyticum in endotracheal tube aspirates from neonates by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1236–1239.
- Ness RB, Markovic N, Carlson CL, Coughlin MT. Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination. *Fertil Steril* 1997; 68:205-213
- Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 1997; 12:925-929.
- Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, Fine D, Hadgu A, Matsuda B, Osmond D, Campbell J, Stamm WE. Head-to-head evaluation of five Chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. *J of Clin Microbiol* 1999; 37:681-685.
- Newhall WJ, Jones RB. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *J Bacteriol* 1983; 154:998-1001.
- Neyrolles, Ferris S, Behbahani N, Montagnier L, Blanchard A. Organization of Ureaplasma urealyticum urease gene cluster and expression in a suppressor strain of Escherichia coli. *J Bacteriol* 1996; 178:647-655, Vol 178, No. 3
- Ngan CCL, Lim T, Choo C, Toh GL, Lim Y. Susceptibility testing of Singapore strains of Mycoplasma hominis to tetracycline, gatifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin, clindamycin and azithromycin by the Etest method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:207-210.
- Nolte FS. Cumitech 34: Laboratory diagnosis of Mycoplasma infections. Washington, DC. ASM press, 2003; 30p
- Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:2756-2761.
- Núñez-Troconis JT. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in different gynecological diseases. *Invest Clin* 1999; 40:9-24.
- Olivera M, Ruiz T, MV, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 2006; 19:426-436
- Olivieri MT, Vera O, Rosenberg E, Brofenmayer S, Muñoz MG. Relación entre autoinmunidad espermática e infección por Chlamydia trachomatis. *Clínica Médica H.C.C.* 1996; 1(1):33-42
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A.J. Jr and Alvarez, J.G. Characterization of subset of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.*, (2001; 16, 1912
- Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de las infecciones de transmisión sexual: proyecto de estrategia mundial. 59ª Asamblea Mundial de la Salud. 2006.

- Ostos OL, Mérida R. Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. *Nova* 2003; 1:81-93
- Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5:433-447.
- Paavonen J, Wolner-Hanssen P. Chlamydia trachomatis: a major treat to reproduction. *Hum Reprod* 1989; 4:111-124.
- Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. *Human Fertility* 2004; 7:271-276.
- Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Raherison S, Bebear C, Bebear CM. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 6:3142-3150.
- Pereyre S, Metifiot M, Cazanave C, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. Characterization of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:207-211.
- Pinna GS, Skevaki CL, Kafetzis DA. The significance of *Ureaplasma urealyticum* as a pathogenic agent in the pediatric population. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19:283-289.
- Ponce P, Foresto P, Valverde J. Estados larvales de *Ascaris lumbricoides*: capacidad de unión a ácido hialurónico. *Invest Clin* 50(1): 5 - 12, 2009
- Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mändar R. The limit of leukocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 2003; 35:271-8.
- Quint KD, Bom RJ, Quint WG, Bruisten SM, Van Der Loeff MF, Morré SA, De Vries HJ. Anal infections with concomitant Chlamydia trachomatis genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *BMC Infect Dis*. 2011 Mar 14;11:63
- Rajalingam K, Sharma M, Lohmann C, Oswald M, Thieck O, Froelich CJ, Rudel T. Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in Chlamydia trachomatis-infected cells. *PLoS ONE* 2008; 3:3102.
- Rajeev SK, Reddy KV. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 2004;19:234-242
- Ramos B, Gallegos G. Non Specific Genital Infections Diagnosed By Fresh Cytological Analysis. *International Congress of Andrology* 2001; 23:299.
- Ramos B, Gallegos G, Cruz R. Utilidad el Examen Citológico en Fresco Para la Detección de Proceso Inflamatorio Asociado a la Presencia de Chlamydia trachomatis y Mycoplasma sp. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2002; 22(3):98
- Raulton J, et al. Localization of C. trachomatis heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro. *Inf and Immunity* 1998; 66:2323-2329.
- Raulton J. Chlamydial envelope components and pathogen host cell interaction. *Mol Microb* 1995; 15:607-616.
- Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol* 1992; 138:407.
- Razin S, Yogev D, Noat Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol and Mol Biol Rev* 1998; 62:1094-1156.
- Razin S. DNA probes and PCR in Diagnosis of Mycoplasma infection. *Molec Cellular Probes* 1994; 8:497-502.
- Razin S. Molecular biology and genetics of Mycoplasmas (mollicutes). *Microbiol Rev* 1985; 49:419-455.
- Rehewy MS, Thomas AJ, Hafez ES, Brown WJ, Moghissi KS, Jaszczak S. *Ureaplasma urealyticum* (T-Mycoplasma) in seminal plasma and spermatozoa from infertile and fertile volunteers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1978; 8:247-251.
- Reichert M, Kahane I, Bartoov B. In Vivo and In Vitro Impairment of Human and Ram Sperm Nuclear Chromatin. Integrity by Sexually Transmitted *Ureaplasma urealyticum* Infect. *Biol of Reprod*. 63, 1041-1048 (2000)
- Reichert M, Levi H, Kahane I, Bartoov B. Dual energy metabolism-dependent effect of *Ureaplasma urealyticum* infection on sperm activity. *J Andrology* 2001;22:404-12
- Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 6th ed. Amsterdam, Elsevier, 2006; 2:1313.
- Rivero N. Infección por Chlamydia pneumoniae y crisis asmática: estudio serológico en el área 10 de la comunidad de Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2001.
- Robertson JA, Vekris A, Bebear C, Stemkeg W. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1993; 31:824-830.

- Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology* 2009; 135:2-21
- Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male fertility. *Hum Reprod Up* 2004;10:3951
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999;4: 31-7
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic fertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2002; 78: 313-8.
- Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M., Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *J of Reprod Immunology* 2005; 67:51-56.
- Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicardi E, Salmeri M, Calogero A. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 2006;21(1):134-137
- Schachter J, Grossman M. Infectious diseases of the fetus and new born infant. 5th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2001; 769-778
- Schachter J. Immunodiagnosis of sexually transmitted diseases. *Yale J Biol Med* 1985; 58:443-452.
- Schelonka RL, Waites KB. Ureaplasma infection and neonatal lung disease. *Semin Perinatol* 2007; 31:2-9.
- Schiefer HG. Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for a etiologic classification. *Andrologia* 1998; 30:7-13.
- Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner, Marchetti F. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007;22:180-187
- Schulte R. T., Ohl DA, Sigma M; Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2009;10
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005; 20: 3446-51.
- Seto S, Kenry T, Myyata M. Involvement of P1 Adhesin in Gliding Motility of Mycoplasma pneumoniae as Revealed by the Inhibitory Effects of Antibody under Optimized Gliding Conditions. *J Bacteriol* 2005; 187, 1875-1877.
- Sharara FI, Queenan JT. Elevated serum Chlamydia trachomatis IgG antibodies. Association with decreased implantation rates in GIFT. *J Reprod Med* 1999; 44:581-586
- Sheeder J; Stevens-Simon C; Lezotte D; Glazner J; Scott S. Cervicitis: To treat or not to treat? The role of patient preferences and decision analysis. *Journal of Adolescent Health* 2006; 39(6):887-892.
- Shepard MC. Nongonococcal urethritis associated with human strain of "T" Mycoplasmas. *JAMA* 1970; 211:1335-1340.
- Sinawat S. The environmental impact on male fertility. *J Med Assoc Thai* 2000;83:880-885
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175: 184-91
- Skilton RJ, Cutcliffe LT, Barlow D, Wang Yibing, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Penicillin Induced Persistence in Chlamydia trachomatis : High Quality Time Lapse Video Analysis of the Developmental Cycle. *Plos One* 2009; 4:1-8.
- Smelov V, Krylova T, Smelova N, Norman L. Azithromycin treatment follow-up: antibacterial susceptibility of Chlamydia trachomatis in patients with chronic prostatitis.. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23S1:79-82.
- Solis EA, Gatti VN, Bouvet BR, Brufman AS, Provenzal C, Feldman R. Round cells in semen and genital infections. *Arch Esp Urol* 2000; 53:101-105.
- Solis R, Vázquez T, Celis S, Hernández L. Susceptibilidad de Mycoplasma hominis y Ureaplasma urealyticum ante diferentes antibióticos. *Rev Med UV* 2006; 6(2): 11-17.
- Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant Chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* 2000; 181:1421-1427.
- Song GJ, Norkus EP, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl* 2006; 29: 569-75.
- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: Chlamydia trachomatis. *SCIENCE* 1998 282, 754-9

- Stevens-Simon C, Sheeder J, Harter S. Teen contraceptive decisions: childbearing intentions are the tip of the iceberg. *Women Health* 2005; 42:55-73
- Storz J, Kaltenboeck B. The Chlamydiales. In: Woldehiwet Z, Ristic M. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Oxford, UK. Pergamon Press, 1993:27-64.
- Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 1993; 59:197-201.
- Stratton CW, Mitchell MW. The Immunopathology of Chlamydial Infections. *AIDEX* 1997; 16:89-94.
- Stratton CW, Mitchell MW. The Pathogenesis of Chlamydia Infections. *AIDEX* 1996; 15:83-90.
- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid Peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530.
- Svenstrup H, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod* 2003; 18:2103-2109.
- Swain GR, McDonalds RA, Pfister JR, Gradus S, Sedmak GV, Singh A. Decision analysis: point-of-care Chlamydia testing vs laboratory methods. *Clin Med Res* 2004; 2:29-35.
- Talkington DF, Davis JK, Cannup KC, Garret BK, Waites KB, Huster GA, Cassel GH. The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration in vitro. *Fertil Steril* 1991; 55:170-176.
- Tamer M, Said U, Paasch H, Juergen G, Ashok A. Role of caspases in male infertility. *Hum. Reprod* 2004; 39-51.
- Tapia R, Rojas J. Semiología del análisis del semen. *Colegio Mexicano de Urología*. 2003; 18:48:52
- Taylor-Robinson D. Genus II. *Ureaplasma*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1984. pp: 770-775.
- Taylor-Robinson D. *Mycoplasma genitalium*-an update. *Int J STD & AIDS* 2002; 13:145-151.
- Tesarik J. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2006;12:715-21.
- Theunissen HJ, Lemmens NA, Burggraaf A, Soltz E, Michel MF. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *C. pneumoniae* in aerosols. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:258-259.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 753-758.
- Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF/ICSI treatment. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2007; 47:216-21
- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, Van Der Veen F. Value of detecting leucocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril* 1998; 70:315-319.
- Tully JG, Taylor -Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered *Mycoplasma* in the human urogenital tract. *Lancet* 1981; 1:1288-1291.
- Urbina MT, Medina R, Muñoz G, Sánchez V, Benjamín I, Lerner J. Infección por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010; 70(2):90-96
- Van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2005; 59, 86-91
- Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update*, 2001; 495 – 500
- Vannuffel P, Cocito C. Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides. *Drugs*. 1996; 51S: 20-30.
- Vázquez A, Cruz C, Vázquez R. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en población con prácticas de riesgo, un estudio de 3 años. *Enferm Infecc Microbiol* 1998; 18:S40.
- Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. *Chlamydiae* in the ejaculate: their influence in the quality and morphology of the sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83:656-660.
- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002; 34:155-161.

- Vigil P, Wöhler C, Bustos-Obregón E, Comhaire F, Morales P. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26:55–60.
- Villanueva-Díaz CA, Flores-Reyes GA, Beltrán-Zúñiga M, Echavarría-Sánchez M, Ortiz-Ibarra, FJ, Arredondo-García JL. Bacteriospermia and male infertility: a method for increasing the sensitivity of semen culture. *Int J Fertil Women Med* 1999; 44:198-203.
- Villegas H, Piñón M, Shor V, Karchmer S. Electron microscopy of *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract. *Arch Androl* 1991; 27:117-126.
- Waites K, Talkington D. New Developments in Human Diseases due to Mycoplasmas, In: Blanchard A, Browning G. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. UK, Horizon Bioscience, 2005. pp. 319–32.
- Waites KB, Rikihisa Y, Taylor-Robinson D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, In Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, DC, ASM Press 2003; 972–990.
- Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 697–728.
- Wang S, Pap J, Stam W, Peeling R, Martin D, Holmes K. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *JID* 2005; 191:917-923.
- Wang Y, Liang C, Wu J, Xu C, , Qin S, Gao S. Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality? *Asian J Androl* 2006 Sep; 8: 562–568
- Ward AM, Rogers JH, Estcourt CS. *Chlamydia trachomatis* infection mimicking testicular malignancy in a young man. *Sexually Transmitted Infections* 1999; 75:270.
- Weidner W, Ludwig M, Miller J. Therapy in male accessory gland infection-what is fact, what is fiction? *Andrologia* 1998; 30:87-90.
- Westrom LV. *Chlamydia trachomatis*-clinical significance and strategies of intervention. *Semin Dermatol* 1990; 9:117-125.
- Whittington WL, Kent C, Kissinger P. Determinants of persistent and recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in young women: results of a multicenter cohort study. *Sex Trans Dis* 2001; 28:117 – 23.
- Wiggins RC, Holmes CH, Andersson M, Ibrahim F, Low N, Horner PJ. Quantifying leukocytes in first catch urine provides new insights into our understanding of symptomatic and asymptomatic urethritis. *Int J STD AIDS* 2006; 17:289-295.
- Wilson DP, Timms P, McElwain DL, Bavoil PM. Type III secretion, contact-dependent model for the intracellular development of *Chlamydia*. *Bull Math Biol*. 2006; 68:161-78
- Witkin SS. Immunological aspects of genital chlamydia infections. *Best Pract Res Clin Obstet. Gynaecol* 2002; 16; 865-874.
- Wolff H. Methods for the detection of male genital tract inflammation. *Andrologia* 1998; 30:35-39.
- Wolner-Hanssen P, Mardh PA. In vitro tests of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984; 42:102-107.
- World Health Organization (WHO). In: Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: World Health Organization, 2001:1-43.
- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth Edition, Cambridge University Press, 1992.
- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition, WHO Press, Geneva, Switzerland 2010
- Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF. The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia* 1997; 29:219-226.
- Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Antibiotic therapy and leukocytospermia: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 1995; 63:142-147.
- Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril* 1996; 66:822–5.
- Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40; 1451-1455.
- Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 1987; 48:711-734.
- Zdrodowska B, Ostaszewska I, Badyda J, Galewska Z. The effect of *Chlamydia trachomatis* infection of the prostate gland on

the concentration of citric acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006; 54:69–73.

Zhang Zh, Zhang Hg, Dong Y, Han R, Dai R, Liu R. *Ureaplasma urealyticum* in Male Infertility in Jilin Province, North-east China, and Its Relationship with Sperm Morphology. *J Ind Med Res* 2011; 39: 33 – 40

Zheng J, Yu SY, Jia DS, Yao B, Ge YF, Shang XJ, Huang YF. *Ureaplasma urealyticum* infection in the genital tract reduces seminal quality in infertile men. *Zhonghua Nan Ke Xue*.

2008; 14:507-12.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-7

Zini A, San Gabriel M, Baazeem A.. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:427–432.

ANEXO

Tabla V. Parámetros citológico asociados a inflamación en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento.

| | | Células redondas por campo | Leucocitos Peroxidasa Positivos | Fagocitos Peroxidasa Positivos |
|--|----------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,89 | 14285,71 | 28571,43 |
| | DS | 1,50 | 35634,83 | 59982,36 |
| | M _e | 1,00 | 0,0 | 0,0 |
| | Min | 0,00 | 0,0 | 0,0 |
| | Max | 5,00 | 100000 | 200000 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 2,77 | 265000 | 315000 |
| | DS | 1,41 | 207180,87 | 241575,45 |
| | M _e | 2,00 | 200000 | 300000 |
| | Min | 1,00 | 100000 | 100000 |
| | Max | 8,00 | 1200000 | 1200000 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 2,96 | 224285,71 | 251428,57 |
| | DS | 1,54 | 157595,81 | 191480,02 |
| | M _e | 3,00 | 200000 | 200000 |
| | Min | 1,00 | 100000 | 100000 |
| | Max | 10,00 | 900000 | 1200000 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 2,66 | 160714,29 | 200000 |
| | DS | 1,24 | 122146,52 | 157884,57 |
| | M _e | 2,00 | 150000 | 200000 |
| | Min | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 8,00 | 700000 | 800000 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 |
| | X | 2,80 | 140178,57 | 160714,29 |
| | DS | 1,83 | 140265,87 | 165889,97 |
| | M _e | 2,00 | 100000 | 100000 |
| | Min | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 800000 | 800000 |
| n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M _e = Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo | | | | |

Tabla VI-A. Defectos de la cabeza del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento.

| | | Macrocéfalo | Microcéfalo | Bicéfalo | Cabeza piriforme | Cabeza de Alfiler |
|----------------------|----------------------|-------------|-------------|----------|------------------|-------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,79 | 1,07 | 0,71 | 1,50 | 0,50 |
| | DS | 2,59 | 1,36 | 0,90 | 2,33 | 1,26 |
| | M_e | 1,00 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 4,00 | 3,00 | 9,00 | 6,00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 0,23 | 0,46 | 0,33 | 4,80 | 0,31 |
| | DS | 0,78 | 0,97 | 0,94 | 3,43 | 1,27 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 14,00 | 8,00 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 0,51 | 0,57 | 0,14 | 4,96 | 0,19 |
| | DS | 1,25 | 1,20 | 0,52 | 3,78 | 0,82 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 8,00 | 6,00 | 3,00 | 15,00 | 6,00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 0,60 | 0,73 | 0,46 | 5,00 | 0,47 |
| | DS | 1,11 | 1,15 | 1,03 | 3,40 | 1,27 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 6,00 | 4,00 | 6,00 | 16,00 | 8,00 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 |
| | X | 1,79 | 1,46 | 0,95 | 4,14 | 0,50 |
| | DS | 1,51 | 1,43 | 1,30 | 2,69 | 1,03 |
| | M_e | 2,00 | 1,50 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 5,00 | 6,00 | 5,00 | 12,00 | 5,00 |

n= recuento, *X*=media, *DS*=Desviación estándar, *M_e*= Mediana, *Min*=Mínimo ,*Max*=Máximo

Pruebas de efectos intra-sujetos.

| Origen | | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. | Eta al cuadrado parcial | Parámetro de no centralidad Parámetro | Potencia observada ^a |
|----------|---------------------|----------------------------|---------|------------------|-------|------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo | Esfericidad asumida | 235,661 | 3 | 78,554 | 6,897 | ,000 | ,111 | 20,690 | ,976 |
| | Greenhouse-Geisser | 235,661 | 2,835 | 83,121 | 6,897 | ,000 | ,111 | 19,553 | ,971 |
| | Huynh-Feldt | 235,661 | 3,000 | 78,554 | 6,897 | ,000 | ,111 | 20,690 | ,976 |
| | Límite-inferior | 235,661 | 1,000 | 235,661 | 6,897 | ,011 | ,111 | 6,897 | ,732 |
| Error | Esfericidad asumida | 1879,339 | 165 | 11,390 | | | | | |
| (tiempo) | Greenhouse-Geisser | 1879,339 | 155,934 | 12,052 | | | | | |
| | Huynh-Feldt | 1879,339 | 165,000 | 11,390 | | | | | |
| | Límite-inferior | 1879,339 | 55,000 | 34,170 | | | | | |

a. Calculado con $\alpha = ,05$

Prueba de esfericidad de Mauchly ($W=0,902$; $p=0,483$) no es significativa, por lo que asumimos que no se viola el criterio de esfericidad y por lo tanto no es necesario utilizar ninguna corrección. La potencia de la prueba es del 97,6% Esos resultados nos indican que si repitiéramos este experimento en un determinado número de veces en el 97,6% de ellos encontraríamos diferencias significativas al nivel del 5% indicando por lo tanto que, el valor promedio de la variable Morfología Defectos Cabeza se modifica significativamente a lo largo del tiempo.

Tabla VII-A. Defectos Del núcleo del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento.

| | | Núcleo Disminuido | Núcleo Elongado | Binucleado | Multinucleado | Núcleo segmentado | Núcleo descondensado | Núcleo vacuolado |
|--|----------------|----------------------|--------------------|------------|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1.57 | 5.54 | .39 | .18 | .18 | 1.50 | 3.68 |
| | DS | 2.56 | 4.95 | 1.23 | .55 | .67 | 2.78 | 5.13 |
| | M _e | .00 | 4.00 | .00 | .00 | .00 | .50 | 2.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 7.00 | 18.00 | 6.00 | 2.00 | 3.00 | 14.00 | 19.00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 1.89 | 3.36 | .09 | .07 | .39 | 3.70 | 7.31 |
| | DS | 2.26 | 2.64 | .33 | .35 | 1.62 | 3.16 | 4.17 |
| | M _e | 1.50 | 4.00 | .00 | .00 | .00 | 4.00 | 7.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 10.00 | 13.00 | 2.00 | 2.00 | 10.00 | 12.00 | 18.00 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 1.89 | 3.54 | .09 | .01 | .30 | 3.73 | 7.89 |
| | DS | 2.53 | 3.02 | .50 | .12 | 1.22 | 3.52 | 3.52 |
| | M _e | 1.00 | 4.00 | .00 | .00 | .00 | 4.00 | 8.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 12.00 | 12.00 | 4.00 | 1.00 | 7.00 | 16.00 | 20.00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 3.06 | 3.03 | .20 | .16 | .34 | 2.93 | 6.13 |
| | DS | 3.97 | 2.97 | .55 | .53 | 1.21 | 2.31 | 2.93 |
| | M _e | 2.00 | 4.00 | .00 | .00 | .00 | 3.00 | 6.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 18.00 | 16.00 | 2.00 | 2.00 | 9.00 | 9.00 | 13.00 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 |
| | X | 1.98 | 2.89 | .43 | .27 | .36 | 3.32 | 5.04 |
| | DS | 2.35 | 2.70 | .91 | .70 | .92 | 2.49 | 2.04 |
| | M _e | 2.00 | 2.00 | .00 | .00 | .00 | 3.00 | 5.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | 1.00 |
| | Max | 14.00 | 10.00 | 3.00 | 3.00 | 5.00 | 11.00 | 10.00 |
| n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M _e = Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo | | | | | | | | |

Tabla VIII-A. Defectos del acrosoma del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento.

| | | Acrosoma mayor de 70 | Acrosoma de 20-39 | Acrosoma menor de 20 | Sin Acrosoma Amorfo | Sin acrosoma redondo | Acrosoma vacuolado |
|--|----------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | .46 | 1.25 | 10.93 | 2.64 | 3.64 | 2.68 |
| | DS | 1.00 | 3.22 | 7.93 | 2.75 | 3.07 | 4.01 |
| | M _e | .00 | .00 | 10.00 | 2.00 | 3.00 | .00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 4.00 | 16.00 | 34.00 | 10.00 | 15.00 | 12.00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | .97 | 1.37 | 5.16 | 1.89 | 2.83 | 4.31 |
| | DS | 1.54 | 2.24 | 4.79 | 2.26 | 3.50 | 4.59 |
| | M _e | .00 | .00 | 4.00 | 2.00 | 2.00 | 4.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 6.00 | 10.00 | 18.00 | 10.00 | 22.00 | 29.00 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | .83 | 1.24 | 5.10 | 1.37 | 2.70 | 4.33 |
| | DS | 1.65 | 1.94 | 4.91 | 1.92 | 2.95 | 3.02 |
| | M _e | .00 | .00 | 4.00 | .00 | 2.00 | 4.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 10.00 | 8.00 | 22.00 | 8.00 | 16.00 | 12.00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 2.13 | 1.93 | 4.79 | 2.04 | 2.74 | 4.23 |
| | DS | 3.06 | 2.27 | 4.07 | 2.17 | 2.54 | 2.61 |
| | M _e | 2.00 | 2.00 | 4.00 | 2.00 | 2.00 | 4.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 20.00 | 11.00 | 18.00 | 8.00 | 14.00 | 15.00 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 |
| | X | 2.45 | 2.04 | 4.98 | 2.18 | 2.91 | 4.71 |
| | DS | 2.46 | 1.87 | 3.93 | 1.60 | 2.85 | 3.10 |
| | M _e | 2.00 | 2.00 | 4.00 | 2.00 | 2.00 | 4.00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 10.00 | 10.00 | 16.00 | 5.00 | 16.00 | 15.00 |
| n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M _e = Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo | | | | | | | |

Pruebas de efectos intra-sujetos.

| Origen | | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. | Eta al cuadrado parcial | Parámetro de no centralidad Parámetro | Potencia observada ^a |
|----------|---------------------|----------------------------|---------|------------------|-------|------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo | Esfericidad asumida | 538,621 | 3 | 179,540 | 5,381 | ,001 | ,089 | 16,142 | ,930 |
| | Greenhouse-Geisser | 538,621 | 2,827 | 190,523 | 5,381 | ,002 | ,089 | 15,212 | ,919 |
| | Huynh-Feldt | 538,621 | 2,996 | 179,774 | 5,381 | ,001 | ,089 | 16,121 | ,930 |
| | Límite-inferior | 538,621 | 1,000 | 538,621 | 5,381 | ,024 | ,089 | 5,381 | ,625 |
| Error | Esfericidad asumida | 5505,629 | 165 | 33,367 | | | | | |
| (tiempo) | Greenhouse-Geisser | 5505,629 | 155,488 | 35,409 | | | | | |
| | Huynh-Feldt | 5505,629 | 164,786 | 33,411 | | | | | |
| | Límite-inferior | 5505,629 | 55,000 | 100,102 | | | | | |

Prueba de esfericidad de Mauchly ($W=0,914$; $p=0,433$). No se viola el criterio de esfericidad y por lo tanto no es necesario utilizar ninguna corrección. La potencia de la prueba es del 93%. Esos resultados nos indican que si repitiéramos este experimento en un determinado número de veces en el 93% de ellos encontraríamos diferencias significativas al nivel del 5% indicando por lo tanto que, el valor promedio de la variable Morfología Defectos Acrosoma se modifica significativamente a lo largo del tiempo ($p=0,001$).

Tabla IX-A. Defectos de la pieza media del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento.

| | | Pieza media engrosada | Pieza media doblada | Citoplasma residual |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 |
| | X | 21.14 | 9.86 | 7.32 |
| | DS | 9.74 | 7.28 | 6.38 |
| | M_e | 20.00 | 7.50 | 6.50 |
| | Min | 4.00 | .00 | .00 |
| | Max | 42.00 | 26.00 | 25.00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 14.33 | 9.93 | 7.11 |
| | DS | 5.04 | 5.40 | 3.54 |
| | M_e | 14.00 | 10.00 | 6.00 |
| | Min | 3.00 | .00 | .00 |
| | Max | 31.00 | 25.00 | 16.00 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 15.36 | 10.36 | 6.90 |
| | DS | 4.89 | 5.11 | 3.70 |
| | M_e | 15.00 | 10.00 | 7.00 |
| | Min | 4.00 | 1.00 | .00 |
| | Max | 33.00 | 22.00 | 20.00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 |
| | X | 13.59 | 9.54 | 6.73 |
| | DS | 5.01 | 5.18 | 3.35 |
| | M_e | 14.00 | 10.00 | 6.00 |
| | Min | 3.00 | 1.00 | .00 |
| | Max | 26.00 | 24.00 | 18.00 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 |
| | X | 12.14 | 8.68 | 6.45 |
| | DS | 4.54 | 4.27 | 2.95 |
| | M_e | 12.00 | 8.00 | 6.00 |
| | Min | 3.00 | .00 | .00 |
| | Max | 24.00 | 23.00 | 14.00 |
| <i>n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo</i> | | | | |

Tabla IX-B. Morfología de defectos de la pieza media. Modelo Lineal General.

Pruebas de efectos intra-sujetos.

| Origen | | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. | Eta al cuadrado parcial | Parámetro de no centralidad Parámetro | Potencia observada ^a |
|----------|---------------------|----------------------------|---------|------------------|--------|------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| | | 889,728 | 3 | 296,576 | 10,794 | ,000 | ,164 | 32,382 | ,999 |
| Tiempo | Esfericidad asumida | 889,728 | 2,764 | 321,936 | 10,794 | ,000 | ,164 | 29,831 | ,998 |
| | Greenhouse-Geisser | 889,728 | 2,925 | 304,230 | 10,794 | ,000 | ,164 | 31,567 | ,999 |
| | Huynh-Feldt | 889,728 | 1,000 | 889,728 | 10,794 | ,002 | ,164 | 10,794 | ,898 |
| | Límite-inferior | 4533,522 | 165 | 27,476 | | | | | |
| Error | Esfericidad asumida | 4533,522 | 152,002 | 29,825 | | | | | |
| (tiempo) | Greenhouse-Geisser | 4533,522 | 160,849 | 28,185 | | | | | |
| | Huynh-Feldt | 4533,522 | 55,000 | 82,428 | | | | | |
| | Límite-inferior | 889,728 | 3 | 296,576 | 10,794 | ,000 | ,164 | 32,382 | ,999 |

Prueba de esfericidad de Mauchly ($W=0,881$; $p=0,238$) no significativa, No se viola el criterio de esfericidad y por lo tanto no es necesario utilizar ninguna corrección. Como se puede ver en la tabla, la potencia de la prueba es del 93% Esos resultados nos indican que si repitiéramos este experimento en un determinado número de veces en el 93% de ellos encontraríamos diferencias significativas al nivel del 5% indicando por lo tanto que, el valor promedio de la variable Morfología Defectos Pieza Media se modifica significativamente a lo largo del tiempo ($p<0,001$).

Tabla X-A. Defectos de la pieza principal del flagelo del espermatozoide en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento.

| | | Flagelo Enrollado | Flagelo Corto | Flagelo Grueso | Flagelo Doble |
|---|----------------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 8.64 | 1.71 | 5.86 | 3.18 |
| | DS | 6.98 | 2.19 | 8.47 | 4.57 |
| | M_e | 7.50 | 1.00 | 2.00 | 1.50 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 26.00 | 8.00 | 36.00 | 18.00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 10.71 | 3.97 | 13.40 | .74 |
| | DS | 6.02 | 2.73 | 5.87 | 1.92 |
| | M_e | 10.00 | 4.00 | 14.00 | .00 |
| | Min | .00 | .00 | 1.00 | .00 |
| | Max | 32.00 | 14.00 | 33.00 | 14.00 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 11.23 | 3.87 | 12.04 | .47 |
| | DS | 6.71 | 2.52 | 5.98 | 1.10 |
| | M_e | 10.00 | 4.00 | 12.50 | .00 |
| | Min | .00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 48.00 | 10.00 | 25.00 | 5.00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 10.21 | 4.34 | 12.79 | 1.04 |
| | DS | 5.26 | 2.87 | 5.13 | 1.74 |
| | M_e | 10.00 | 4.00 | 14.00 | .00 |
| | Min | 1.00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 28.00 | 17.00 | 24.00 | 8.00 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 | 56 |
| | X | 9.82 | 4.98 | 12.16 | 1.95 |
| | DS | 4.97 | 2.37 | 4.87 | 1.84 |
| | M_e | 10.00 | 5.00 | 12.00 | 2.00 |
| | Min | 2.00 | .00 | .00 | .00 |
| | Max | 20.00 | 14.00 | 22.00 | 7.00 |
| <i>n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo</i> | | | | | |

Tabla X-B. Morfología de defectos de la pieza principal. Modelo Lineal General.

Pruebas de efectos intra-sujetos.

| Origen | | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. | Eta al cuadrado parcial | Parámetro de no centralidad Parámetro | Potencia observada ^a |
|----------|---------------------|----------------------------|---------|------------------|------|------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| | | 53,371 | 3 | 17,790 | ,384 | ,764 | ,007 | 1,153 | ,125 |
| Tiempo | Esfericidad asumida | 53,371 | 2,651 | 20,129 | ,384 | ,740 | ,007 | 1,019 | ,120 |
| | Greenhouse-Geisser | 53,371 | 2,798 | 19,073 | ,384 | ,751 | ,007 | 1,075 | ,122 |
| | Huynh-Feldt | 53,371 | 1,000 | 53,371 | ,384 | ,538 | ,007 | ,384 | ,093 |
| | Límite-inferior | 7638,379 | 165 | 46,293 | | | | | |
| Error | Esfericidad asumida | 7638,379 | 145,830 | 52,379 | | | | | |
| (tiempo) | Greenhouse-Geisser | 7638,379 | 153,901 | 49,632 | | | | | |
| | Huynh-Feldt | 7638,379 | 55,000 | 138,880 | | | | | |
| | Límite-inferior | 53,371 | 3 | 17,790 | ,384 | ,764 | ,007 | 1,153 | ,125 |

No existen diferencias significativas a lo largo del tiempo para la variable Morfología Defectos Pieza Principal (p=0,764).

Tabla XI. Dispersión de la cromatina en muestras de pacientes infértiles obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva de todos los valores.

| <i>DN :Dispersión normal</i> <i>DA: Dispersión anormal</i> | | DN de la cromatina Células | DN de la cromatina % | DA de la cromatina Células | DA de la cromatina % | Halo Grande células | Halo Grande % | Halo mediano células | Halo Mediano o% | Halo Chico Células | Halo Chico 100% | Sin halo células | Sin halo 100% | Núcleo degradado células | Núcleo degradado % |
|---|----------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Control | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 462,39 | 92,48 | 37,61 | 7,52 | 371,89 | 74,38 | 90,50 | 18,10 | 32,11 | 6,42 | 4,96 | 0,99 | 0,54 | 0,11 |
| | DS | 18,27 | 3,65 | 18,27 | 3,65 | 35,62 | 7,12 | 27,96 | 5,59 | 17,00 | 3,40 | 4,50 | 0,90 | 1,35 | 0,27 |
| | M_e | 465,50 | 93,10 | 34,50 | 6,90 | 383,50 | 76,70 | 90,50 | 18,10 | 27,00 | 5,40 | 4,50 | 0,90 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 415,00 | 83,00 | 13,00 | 2,60 | 291,00 | 58,20 | 37,00 | 7,40 | 11,00 | 2,20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 487,00 | 97,40 | 85,00 | 17,00 | 419,00 | 83,80 | 175,00 | 35,00 | 73,00 | 14,60 | 14,00 | 2,80 | 5,00 | 1,00 |
| Basal | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 277,29 | 55,46 | 222,71 | 44,54 | 136,81 | 27,36 | 140,47 | 28,09 | 135,76 | 27,15 | 77,67 | 15,53 | 9,29 | 1,86 |
| | DS | 43,25 | 8,65 | 43,25 | 8,65 | 40,26 | 8,05 | 32,92 | 6,58 | 38,40 | 7,68 | 28,95 | 5,79 | 7,71 | 1,54 |
| | M_e | 279,50 | 55,90 | 220,50 | 44,10 | 133,50 | 26,70 | 139,50 | 27,90 | 132,00 | 26,40 | 76,00 | 15,20 | 8,00 | 1,60 |
| | Min | 161,00 | 32,20 | 119,00 | 23,80 | 78,00 | 15,60 | 55,00 | 11,00 | 63,00 | 12,60 | 6,00 | 1,20 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 381,00 | 76,20 | 339,00 | 67,80 | 232,00 | 46,40 | 214,00 | 42,80 | 239,00 | 47,80 | 15500 | 31,00 | 36,00 | 7,20 |
| Primer ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 301,76 | 60,35 | 198,24 | 39,65 | 151,97 | 30,39 | 149,79 | 29,96 | 124,00 | 24,80 | 66,27 | 13,25 | 7,97 | 1,59 |
| | DS | 47,09 | 9,42 | 47,09 | 9,42 | 46,33 | 9,27 | 32,79 | 6,56 | 37,25 | 7,45 | 26,98 | 5,40 | 6,81 | 1,36 |
| | M_e | 302,00 | 60,40 | 198,00 | 39,60 | 141,00 | 28,20 | 151,00 | 30,20 | 124,00 | 24,80 | 60,50 | 12,10 | 6,00 | 1,20 |
| | Min | 174,00 | 34,80 | 105,00 | 21,00 | 75,00 | 15,00 | 69,00 | 13,80 | 45,00 | 9,00 | 19,00 | 3,80 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 395,00 | 79,00 | 326,00 | 65,20 | 284,00 | 56,80 | 222,00 | 44,40 | 221,00 | 44,20 | 143,00 | 28,60 | 30,00 | 6,00 |
| Segundo ciclo | n | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| | X | 329,87 | 65,97 | 170,13 | 34,03 | 167,84 | 33,57 | 162,03 | 32,41 | 105,31 | 21,06 | 57,26 | 11,45 | 7,56 | 1,51 |
| | DS | 46,87 | 9,37 | 46,87 | 9,37 | 54,27 | 10,85 | 40,00 | 8,00 | 33,38 | 6,68 | 23,76 | 4,75 | 8,04 | 1,61 |
| | M_e | 334,00 | 66,80 | 166,00 | 33,20 | 154,00 | 30,80 | 169,50 | 33,90 | 104,50 | 20,90 | 55,50 | 11,10 | 6,00 | 1,20 |
| | Min | 191,00 | 38,20 | 78,00 | 15,60 | 88,00 | 17,60 | 45,00 | 9,00 | 32,00 | 6,40 | 10,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 422,00 | 84,40 | 309,00 | 61,80 | 363,00 | 72,60 | 282,00 | 56,40 | 206,00 | 41,20 | 116,00 | 23,20 | 47,00 | 9,40 |
| Tercer ciclo | n | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 |
| | X | 350,55 | 70,11 | 149,45 | 29,89 | 177,66 | 35,53 | 172,89 | 34,58 | 92,36 | 18,47 | 50,59 | 10,12 | 6,50 | 1,31 |
| | DS | 46,11 | 9,22 | 46,11 | 9,22 | 47,15 | 9,43 | 36,84 | 7,37 | 37,29 | 7,46 | 24,14 | 4,83 | 6,01 | 1,20 |
| | M_e | 361,50 | 72,30 | 138,50 | 27,70 | 174,00 | 34,80 | 174,00 | 34,80 | 84,00 | 16,80 | 46,50 | 9,30 | 5,00 | 1,00 |
| | Min | 207,00 | 41,40 | 71,00 | 14,20 | 92,00 | 18,40 | 91,00 | 18,20 | 28,00 | 5,60 | 11,00 | 2,20 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 429,00 | 85,80 | 293,00 | 58,60 | 301,00 | 60,20 | 283,00 | 56,60 | 203,00 | 40,60 | 130,00 | 26,00 | 29,00 | 5,80 |

N=recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo, Max=Máximo

Pruebas de efectos intra-sujetos.

| Origen | | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Sig. | Eta al cuadrado parcial | Parámetro de no centralidad Parámetro | Potencia observada ^a |
|----------|---------------------|----------------------------|---------|------------------|-------|------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo | Esfericidad asumida | 394,478 | 3 | 131,493 | 4,408 | ,005 | ,074 | 13,225 | ,868 |
| | Greenhouse-Geisser | 394,478 | 2,419 | 163,059 | 4,408 | ,009 | ,074 | 10,665 | ,808 |
| | Huynh-Feldt | 394,478 | 2,539 | 155,397 | 4,408 | ,008 | ,074 | 11,190 | ,822 |
| | Límite-inferior | 394,478 | 1,000 | 394,478 | 4,408 | ,040 | ,074 | 4,408 | ,541 |
| Error | Esfericidad asumida | 4921,772 | 165 | 29,829 | | | | | |
| (tiempo) | Greenhouse-Geisser | 4921,772 | 133,058 | 36,990 | | | | | |
| | Huynh-Feldt | 4921,772 | 139,618 | 35,252 | | | | | |
| | Límite-inferior | 4921,772 | 55,000 | 89,487 | | | | | |

Prueba de esfericidad de Mauchly ($W=0,712$; $p=0,03$), factor de corrección de Greenhouse-Geisser= 0,806). Las diferencias siguen siendo significativas aun después de la corrección ($p=0,009$). Potencia de la prueba es del 80,8% Esos resultados nos indican que si repitiéramos este experimento en un determinado número de veces en el 80,8% de ellos encontraríamos diferencias significativas al nivel del 5% indicando por lo tanto que, el valor promedio de la variable Morfología Lesiones nucleares se modifica significativamente a lo largo del tiempo.

Tabla XVI-A. Parámetros de líquido seminal en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento.

Tablas de Contingencia.

| <i>Esp: Espermatozoides</i> | | Concentración espermática | Esp sin movimiento | Esp con Movimiento in situ | Esp con movimiento curvilíneal | Esp con movimiento rectilíneal | Esp vivos | Esp Muertos | Esp morfología normal | Esp morfología Anormal |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| Basal | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 57800000 | 32,78 | 26,81 | 30,78 | 9,63 | 80,81 | 19,19 | 15,11 | 84,89 |
| | DS | 26500000 | 13,63 | 9,19 | 9,18 | 7,41 | 5,93 | 5,93 | 2,98 | 2,98 |
| | M_e | 53000000 | 34,00 | 28,00 | 32,00 | 8,00 | 81,00 | 19,00 | 15,00 | 85,00 |
| | Min | 3000000 | 14,00 | 11,00 | 0,00 | 0,00 | 68,00 | 7,00 | 10,00 | 79,00 |
| | Max | 131000000 | 88,00 | 43,00 | 45,00 | 27,00 | 93,00 | 32,00 | 21,00 | 90,00 |
| Primero | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 51100000 | 29,78 | 26,44 | 32,04 | 11,74 | 80,19 | 19,81 | 17,48 | 82,52 |
| | DS | 21300000 | 12,11 | 9,98 | 9,25 | 7,36 | 13,05 | 13,05 | 4,22 | 4,22 |
| | M_e | 53000000 | 27,00 | 26,00 | 32,00 | 12,00 | 82,00 | 18,00 | 16,00 | 84,00 |
| | Min | 6400000 | 13,00 | 13,00 | 9,00 | 0,00 | 18,00 | 11,00 | 10,00 | 75,00 |
| | Max | 870000000 | 75,00 | 52,00 | 49,00 | 23,00 | 89,00 | 82,00 | 25,00 | 90,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 65800000 | 26,04 | 24,26 | 33,85 | 15,85 | 83,44 | 16,56 | 19,89 | 80,11 |
| | DS | 41100000 | 7,64 | 8,54 | 7,11 | 7,50 | 3,25 | 3,25 | 3,85 | 3,85 |
| | M_e | 51000000 | 26,00 | 23,00 | 35,00 | 15,00 | 83,00 | 17,00 | 19,00 | 81,00 |
| | Min | 5500000 | 13,00 | 9,00 | 18,00 | 5,00 | 79,00 | 10,00 | 13,00 | 72,00 |
| | Max | 166000000 | 42,00 | 46,00 | 51,00 | 29,00 | 90,00 | 21,00 | 28,00 | 87,00 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | X | 64000000 | 25,71 | 23,90 | 31,71 | 18,67 | 84,05 | 15,95 | 21,38 | 78,62 |
| | DS | 35900000 | 7,77 | 6,92 | 7,88 | 4,54 | 3,14 | 3,14 | 3,85 | 3,85 |
| | M_e | 61000000 | 25,00 | 23,00 | 33,00 | 19,00 | 85,00 | 15,00 | 22,00 | 78,00 |
| | Min | 1750000 | 14,00 | 12,00 | 11,00 | 10,00 | 78,00 | 11,00 | 13,00 | 73,00 |
| | Max | 170000000 | 41,00 | 36,00 | 43,00 | 27,00 | 89,00 | 22,00 | 27,00 | 87,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo

Tabla XVI-B. Parámetros de líquido seminal en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Tablas de Contingencia.

| <i>Esp: Espermatozoides</i> | | Concentración espermática | Esp sin movimiento | Esp con Movimiento in situ | Esp con movimiento curvilíneal | Esp con movimiento rectilíneal | Esp vivos | Esp Muertos | Esp morfología normal | Esp morfología Anormal |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| Basal | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 72600000 | 30,25 | 26,71 | 29,39 | 13,64 | 82,54 | 17,46 | 13,86 | 86,14 |
| | DS | 53500000 | 9,11 | 8,41 | 7,91 | 9,35 | 3,13 | 3,13 | 3,19 | 3,19 |
| | M_e | 62500000 | 29,00 | 26,50 | 31,00 | 12,50 | 81,50 | 18,50 | 14,00 | 86,00 |
| | Min | 3700000 | 19,00 | 12,00 | 12,00 | 0,00 | 77,00 | 11,00 | 8,00 | 80,00 |
| | Max | 198000000 | 59,00 | 41,00 | 45,00 | 31,00 | 89,00 | 23,00 | 20,00 | 92,00 |
| Primero | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 77200000 | 27,93 | 25,14 | 31,07 | 15,86 | 83,21 | 16,79 | 15,75 | 84,25 |
| | DS | 56100000 | 7,09 | 5,32 | 6,15 | 6,55 | 2,36 | 2,36 | 3,33 | 3,33 |
| | M_e | 59300000 | 26,00 | 24,50 | 32,00 | 16,00 | 83,00 | 17,00 | 16,00 | 84,00 |
| | Min | 8200000 | 18,00 | 14,00 | 15,00 | 3,00 | 79,00 | 11,00 | 11,00 | 78,00 |
| | Max | 225000000 | 48,00 | 37,00 | 43,00 | 28,00 | 89,00 | 21,00 | 22,00 | 89,00 |
| Segundo ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 86700000 | 28,82 | 23,32 | 31,00 | 16,86 | 83,50 | 16,50 | 17,25 | 82,75 |
| | DS | 78800000 | 9,84 | 6,75 | 7,60 | 7,76 | 6,13 | 6,13 | 3,83 | 3,83 |
| | M_e | 64000000 | 27,00 | 23,00 | 31,00 | 18,00 | 85,00 | 15,00 | 17,00 | 83,00 |
| | Min | 9800000 | 17,00 | 3,00 | 15,00 | 2,00 | 59,00 | 7,00 | 11,00 | 77,00 |
| | Max | 422000000 | 51,00 | 36,00 | 46,00 | 29,00 | 93,00 | 41,00 | 23,00 | 89,00 |
| Tercer ciclo | n | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | X | 95800000 | 28,80 | 24,36 | 30,96 | 15,88 | 83,16 | 16,84 | 18,72 | 81,28 |
| | DS | 53900000 | 11,49 | 6,37 | 7,40 | 6,39 | 4,53 | 4,53 | 4,26 | 4,26 |
| | M_e | 77000000 | 26,00 | 24,00 | 35,00 | 17,00 | 85,00 | 15,00 | 18,00 | 82,00 |
| | Min | 27100000 | 14,00 | 10,00 | 10,00 | 0,00 | 72,00 | 11,00 | 11,00 | 74,00 |
| | Max | 220000000 | 68,00 | 44,00 | 40,00 | 27,00 | 89,00 | 28,00 | 26,00 | 89,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo

Tabla XVIII. Parámetros citológicos asociados a inflamación para cada uno de los ciclos de tratamiento antibiótico y antioxidante. Estadística descriptiva.

| | Ciclo de Tratamiento | n | Rango | Mín. | Máx | X | E típico | DS. | Varianza |
|-------------------------------|----------------------|----|-------|------|-----|------|----------|------|----------|
| Grupo | | 70 | 0 | 1 | 1 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Células redondas/campo | Basal | 70 | 7 | 1 | 8 | 2.77 | 0.17 | 1.41 | 1.98 |
| Células redondas/campo | Primer | 70 | 9 | 1 | 10 | 2.96 | 0.18 | 1.54 | 2.36 |
| Células redondas/campo | Segundo | 70 | 7 | 1 | 8 | 2.66 | 0.15 | 1.24 | 1.53 |
| Células redondas/campo | Tercer | 56 | 9 | 1 | 10 | 2.80 | 0.24 | 1.83 | 3.36 |
| Células Epiteliales | Basal | 70 | 3 | 0 | 3 | 1.21 | 0.08 | 0.68 | 0.46 |
| Células Epiteliales | Primer | 70 | 2 | 0 | 2 | 1.01 | 0.06 | 0.52 | 0.28 |
| Células Epiteliales | Segundo | 70 | 2 | 0 | 2 | 0.94 | 0.05 | 0.41 | 0.17 |
| Células Epiteliales | Tercer | 56 | 2 | 0 | 2 | 0.84 | 0.06 | 0.42 | 0.17 |
| Restos celulares | Basal | 70 | 1 | 1 | 2 | 1.64 | 0.06 | 0.48 | 0.23 |
| Restos celulares | Primer | 70 | 2 | 0 | 2 | 1.53 | 0.07 | 0.58 | 0.34 |
| Restos celulares | Segundo | 70 | 2 | 0 | 2 | 1.46 | 0.08 | 0.65 | 0.43 |
| Restos celulares | Tercer | 56 | 2 | 0 | 2 | 1.34 | 0.09 | 0.64 | 0.41 |

Tabla XXI. Parámetros citológicos asociados a inflamación en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento.

| | | Leucocitos peroxidasa positivo | | Fagocitos peroxidasa positivos | |
|---------------|----------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| | | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo |
| Basal | n | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 231481,48 | 292857,14 | 283333,33 | 367857,14 |
| | DS | 231694,49 | 192793,44 | 248456,78 | 272238,42 |
| | M_e | 200000 | 200000 | 200000 | 300000 |
| | Min | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 |
| | Max | 1200000 | 750000 | 1200000 | 1100000 |
| Primer ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 212962,96 | 244642,86 | 235185,19 | 278571,43 |
| | DS | 163843,61 | 181219,78 | 240917,64 | 177131,76 |
| | M_e | 200000 | 200000 | 200000 | 200000 |
| | Min | 100000 | 100000 | 100000 | 100000 |
| | Max | 800000 | 900000 | 1200000 | 700000 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 111111,11 | 208928,57 | 151851,85 | 250000 |
| | DS | 83589,35 | 141456,43 | 142425,07 | 175330,38 |
| | M_e | 100000 | 200000 | 100000 | 200000 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 250000 | 700000 | 500000 | 800000 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 25 | 21 | 25 |
| | X | 109523,81 | 186000 | 119047,62 | 212000,00 |
| | DS | 117918,45 | 165529,45 | 172101,85 | 173973,18 |
| | M_e | 100000 | 200000 | 100000 | 200000 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 500000 | 800000 | 800000 | 800000 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo

Tabla XXIII-B. Alteraciones de la cabeza del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva

| | | Macrocefalo | | Microcefalo | | Bicefalo | | Cabeza piriforme | | Cabeza de Alfiler | |
|---------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo |
| Basal | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 0,19 | 0,18 | 0,30 | 0,50 | 0,44 | 0,25 | 4,67 | 5,32 | 0,33 | 0,39 |
| | DS | 0,56 | 0,77 | 0,67 | 1,07 | 1,15 | 0,65 | 3,48 | 3,44 | 1,27 | 1,55 |
| | M _e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 6,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 2,00 | 4,00 | 2,00 | 4,00 | 4,00 | 2,00 | 14,00 | 12,00 | 6,00 | 8,00 |
| Primer ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 0,78 | 0,39 | 0,44 | 0,86 | 0,22 | 0,07 | 4,22 | 5,11 | 0,22 | 0,18 |
| | DS | 1,69 | 0,92 | 0,80 | 1,63 | 0,70 | 0,26 | 4,18 | 3,93 | 1,15 | 0,55 |
| | M _e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 8,00 | 4,00 | 2,00 | 6,00 | 3,00 | 1,00 | 15,00 | 12,00 | 6,00 | 2,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 0,44 | 0,89 | 0,70 | 0,96 | 0,37 | 0,57 | 4,22 | 6,04 | 0,33 | 0,43 |
| | DS | 0,85 | 1,42 | 1,03 | 1,29 | 0,79 | 1,35 | 3,42 | 3,08 | 0,73 | 0,96 |
| | M _e | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 5,50 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 3,00 | 6,00 | 3,00 | 4,00 | 3,00 | 6,00 | 16,00 | 14,00 | 3,00 | 4,00 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 |
| | X | 1,86 | 1,96 | 1,52 | 1,44 | 0,95 | 0,68 | 4,00 | 4,40 | 0,33 | 0,48 |
| | DS | 1,71 | 1,40 | 1,29 | 1,36 | 1,32 | 1,18 | 2,17 | 2,75 | 0,66 | 0,96 |
| | M _e | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 5,00 | 4,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 4,00 | 9,00 | 11,00 | 2,00 | 4,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo , Max=Máximo

Tabla XXIV-B. Alteraciones en el núcleo del espermatozoide en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Núcleo Disminuido | Núcleo Elongado | Binucleado | Multinucleado | Núcleo segmentado | Núcleo descondensado | Núcleo vacuolado |
|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|------------|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Basal | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 1,96 | 2,89 | 0,07 | 0,19 | 0,33 | 4,22 | 6,74 |
| | DS | 2,59 | 2,49 | 0,27 | 0,56 | 1,21 | 3,65 | 4,10 |
| | M_e | 0,00 | 3,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 8,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 8,00 | 1,00 | 2,00 | 6,00 | 12,00 | 15,00 |
| | | | | | | | | |
| Primer ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 1,67 | 3,30 | 0,15 | 0,04 | 0,15 | 4,26 | 8,00 |
| | DS | 2,66 | 3,27 | 0,77 | 0,19 | 0,53 | 4,70 | 3,66 |
| | M_e | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 8,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 12,00 | 11,00 | 4,00 | 1,00 | 2,00 | 16,00 | 20,00 |
| | | | | | | | | |
| Segundo ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 3,52 | 2,78 | 0,04 | 0,07 | 0,07 | 2,63 | 5,85 |
| | DS | 4,63 | 3,42 | 0,19 | 0,38 | 0,38 | 2,40 | 2,85 |
| | M_e | 2,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 6,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 18,00 | 16,00 | 1,00 | 2,00 | 2,00 | 9,00 | 12,00 |
| | | | | | | | | |
| Tercer ciclo | n | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | X | 2,00 | 2,43 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | 3,38 | 5,10 |
| | DS | 3,10 | 2,77 | 0,44 | 0,30 | 0,22 | 2,82 | 2,07 |
| | M_e | 1,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 5,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 14,00 | 10,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 | 11,00 | 10,00 |
| | | | | | | | | |

n= recuento, *X*=media, *DS*=Desviación estándar, *M_e*= Mediana, *Min*=Mínimo , *Max*=Máximo

Tabla XXIV-C. Alteraciones en el núcleo del espermatozoide en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Núcleo Disminuido | Núcleo Elongado | Binucleado | Multinucleado | Núcleo segmentado | Núcleo descondensado | Núcleo vacuolado |
|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|------------|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Basal | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,75 | 3,68 | 0,14 | 0,00 | 0,64 | 3,46 | 8,36 |
| | DS | 2,15 | 2,91 | 0,45 | 0,00 | 2,26 | 2,80 | 4,18 |
| | M_e | 0,50 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 8,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 7,00 | 13,00 | 2,00 | 0,00 | 10,00 | 10,00 | 18,00 |
| Primer ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 2,39 | 3,75 | 0,07 | 0,00 | 0,61 | 3,68 | 8,29 |
| | DS | 2,67 | 2,90 | 0,26 | 0,00 | 1,83 | 2,70 | 3,20 |
| | M_e | 2,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 8,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 |
| | Max | 9,00 | 12,00 | 1,00 | 0,00 | 7,00 | 11,00 | 16,00 |
| Segundo ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 3,32 | 3,39 | 0,39 | 0,32 | 0,71 | 3,18 | 6,11 |
| | DS | 3,82 | 2,96 | 0,74 | 0,72 | 1,80 | 2,37 | 2,88 |
| | M_e | 2,50 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,50 | 6,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 16,00 | 10,00 | 2,00 | 2,00 | 9,00 | 8,00 | 12,00 |
| Tercer ciclo | n | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | X | 1,96 | 3,36 | 0,84 | 0,52 | 0,72 | 2,92 | 4,64 |
| | DS | 1,81 | 2,51 | 1,18 | 0,96 | 1,28 | 2,33 | 1,82 |
| | M_e | 2,00 | 3,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,00 | 5,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 6,00 | 8,00 | 3,00 | 3,00 | 5,00 | 8,00 | 9,00 |

n= recuento, *X*=media, *DS*=Desviación estándar, *M_e*= Mediana, *Min*=Mínimo , *Max*=Máximo

Tabla XXV-B. Alteraciones en el acrosoma del espermatozoide en pacientes con embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Acrosoma mayor de 70 | Acrosoma de 20-39 | Acrosoma menor de 20 | Sin Acrosoma Amorfo | Sin acrosoma redondo | Acrosoma vacuolado |
|--------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Control Basal | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 0,93 | 1,41 | 6,74 | 1,63 | 2,81 | 3,00 |
| | DS | 1,64 | 2,04 | 5,23 | 2,22 | 3,00 | 3,63 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 6,00 | 0,00 | 2,00 | 2,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 6,00 | 6,00 | 18,00 | 8,00 | 10,00 | 16,00 |
| Primer ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 0,59 | 1,74 | 6,85 | 1,44 | 2,26 | 2,85 |
| | DS | 1,12 | 2,30 | 5,44 | 1,78 | 2,68 | 2,61 |
| | M_e | 0,00 | 1,00 | 6,00 | 0,00 | 2,00 | 3,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 4,00 | 8,00 | 22,00 | 6,00 | 8,00 | 10,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 2,37 | 1,70 | 6,00 | 1,89 | 2,63 | 4,41 |
| | DS | 4,19 | 2,09 | 3,95 | 1,99 | 2,13 | 3,43 |
| | M_e | 1,00 | 1,00 | 5,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 20,00 | 8,00 | 14,00 | 6,00 | 8,00 | 15,00 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | X | 2,95 | 2,24 | 5,43 | 2,48 | 2,48 | 5,05 |
| | DS | 2,84 | 1,84 | 3,85 | 1,57 | 1,89 | 3,50 |
| | M_e | 2,00 | 2,00 | 4,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 6,00 | 14,00 | 5,00 | 7,00 | 15,00 |

n= recuento, *X*=media, *DS*=Desviación estándar, *M_e*= Mediana, *Min*=Mínimo, *Max*=Máximo

Tabla XXV-C. Alteraciones en el acrosoma del espermatozoide en pacientes sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Acrosoma mayor de 70 | Acrosoma de 20-39 | Acrosoma menor de 20 | Sin Acrosoma Amorfo | Sin acrosoma redondo | Acrosoma vacuolado |
|--------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Control Basal | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,00 | 1,64 | 3,64 | 2,18 | 2,32 | 4,89 |
| | DS | 1,59 | 2,72 | 3,48 | 2,51 | 2,52 | 3,88 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 6,00 | 10,00 | 12,00 | 10,00 | 10,00 | 15,00 |
| Primer ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,36 | 0,82 | 3,21 | 1,43 | 2,68 | 5,79 |
| | DS | 2,23 | 1,66 | 2,91 | 2,32 | 2,20 | 2,91 |
| | M_e | 0,00 | 0,00 | 3,00 | 0,00 | 2,50 | 6,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 6,00 | 10,00 | 8,00 | 7,00 | 12,00 |
| Segundo ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 1,96 | 2,39 | 3,57 | 2,46 | 2,64 | 4,25 |
| | DS | 2,25 | 2,66 | 2,74 | 2,49 | 2,42 | 1,96 |
| | M_e | 2,00 | 2,00 | 4,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 11,00 | 9,00 | 8,00 | 11,00 | 8,00 |
| Tercer ciclo | n | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | X | 2,16 | 2,04 | 5,04 | 2,28 | 2,68 | 4,72 |
| | DS | 2,27 | 2,17 | 3,71 | 1,67 | 2,08 | 2,37 |
| | M_e | 2,00 | 2,00 | 4,00 | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 10,00 | 10,00 | 14,00 | 5,00 | 7,00 | 12,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo, Max=Máximo

Tabla XXVI-B. Alteraciones de la pieza media del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Pieza media engrosada | | Pieza media doblada | | Citoplasma residual | |
|---------------|----------------|-----------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | | Embarazo | No Embarazo | Embarazo | No Embarazo | Embarazo | No Embarazo |
| Basal | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 14,52 | 14,96 | 11,26 | 7,96 | 6,67 | 7,50 |
| | DS | 6,02 | 4,59 | 5,62 | 4,92 | 3,77 | 3,33 |
| | M _e | 14,00 | 14,00 | 12,00 | 8,00 | 6,00 | 6,50 |
| | Min | 3,00 | 6,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 31,00 | 24,00 | 23,00 | 20,00 | 16,00 | 14,00 |
| Primer ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 16,00 | 14,57 | 12,41 | 7,86 | 6,41 | 7,71 |
| | DS | 5,40 | 4,68 | 5,04 | 3,70 | 3,69 | 3,99 |
| | M _e | 15,00 | 15,50 | 12,00 | 8,00 | 6,00 | 7,00 |
| | Min | 8,00 | 4,00 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 2,00 |
| | Max | 33,00 | 24,00 | 22,00 | 16,00 | 14,00 | 20,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 13,70 | 12,96 | 11,37 | 7,82 | 7,00 | 6,50 |
| | DS | 5,51 | 4,65 | 5,02 | 5,23 | 3,50 | 3,11 |
| | M _e | 14,00 | 12,50 | 11,00 | 6,50 | 6,00 | 6,00 |
| | Min | 5,00 | 3,00 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 26,00 | 26,00 | 24,00 | 20,00 | 16,00 | 13,00 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 |
| | X | 12,95 | 11,76 | 9,52 | 7,88 | 6,33 | 6,16 |
| | DS | 5,65 | 3,88 | 4,58 | 4,06 | 2,82 | 2,85 |
| | M _e | 12,00 | 12,00 | 8,00 | 8,00 | 6,00 | 6,00 |
| | Min | 5,00 | 3,00 | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 24,00 | 18,00 | 23,00 | 19,00 | 13,00 | 14,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo, Max=Máximo

Tabla XXVII-B. Alteraciones en la pieza principal del flagelo del espermatozoide en pacientes con y sin embarazo. Comparación de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| | | Flagelo enrollado | | Flagelo Corto | | Flagelo Grueso | | Flagelo Doble | |
|---------------|----------------|-------------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|---------------|-------------|
| | | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo | Embarazo | No embarazo |
| Control Basal | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 11,59 | 9,46 | 3,85 | 4,25 | 12,33 | 13,96 | 0,78 | 1,04 |
| | DS | 4,48 | 6,89 | 2,97 | 2,66 | 6,66 | 5,52 | 1,25 | 2,73 |
| | M _e | 12,00 | 8,00 | 4,00 | 4,00 | 12,00 | 14,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 20,00 | 32,00 | 12,00 | 14,00 | 33,00 | 28,00 | 5,00 | 14,00 |
| Primer ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 11,30 | 10,86 | 3,26 | 4,57 | 10,67 | 12,57 | 0,63 | 0,36 |
| | DS | 8,57 | 5,58 | 2,88 | 1,99 | 7,32 | 4,65 | 1,15 | 1,06 |
| | M _e | 8,00 | 12,00 | 4,00 | 4,00 | 12,00 | 12,50 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 48,00 | 23,00 | 10,00 | 8,00 | 22,00 | 25,00 | 4,00 | 5,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 28 |
| | X | 10,11 | 9,11 | 4,04 | 4,32 | 11,63 | 13,39 | 1,33 | 1,11 |
| | DS | 4,97 | 5,81 | 2,53 | 2,37 | 5,75 | 5,22 | 1,80 | 2,01 |
| | M _e | 11,00 | 8,00 | 4,00 | 4,00 | 12,00 | 14,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Min | 4,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 26,00 | 28,00 | 12,00 | 10,00 | 23,00 | 24,00 | 5,00 | 8,00 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 | 21 | 25 |
| | X | 9,76 | 9,52 | 4,38 | 4,96 | 11,05 | 12,92 | 2,14 | 2,32 |
| | DS | 5,20 | 5,18 | 2,11 | 1,72 | 5,32 | 4,56 | 1,88 | 1,93 |
| | M _e | 9,00 | 8,00 | 5,00 | 5,00 | 11,00 | 12,00 | 2,00 | 3,00 |
| | Min | 3,00 | 2,00 | 0,00 | 1,00 | 1,00 | 4,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 18,00 | 20,00 | 7,00 | 8,00 | 22,00 | 22,00 | 6,00 | 7,00 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo, Max=Máximo

Tabla XXVIII-A. Dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras de pacientes con embarazo. Comparación en diferentes tiempos de tratamiento. Estadística Descriptiva.

| <i>DN :Dispersión normal</i> <i>DA: Dispersión anormal</i> | | DN de la cromatina Células | DN de la cromatina % | DA de la cromatina Células | DA de la cromatina % | Halo Grande células | Halo Grande % | Halo mediano células | Halo Mediano % | Halo Chico Células | Halo Chico % | Sin halo células | Sin halo % | Núcleo degradado células | Núcleo degradado % |
|---|----------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------|
| Basal | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 276,63 | 55,33 | 223,37 | 44,67 | 137,56 | 27,51 | 139,07 | 27,81 | 130,89 | 26,18 | 84,44 | 16,89 | 8,04 | 1,61 |
| | DS | 41,28 | 8,26 | 41,28 | 8,26 | 42,98 | 8,6 | 34,65 | 6,93 | 42,29 | 8,46 | 26,94 | 5,39 | 5,99 | 1,2 |
| | M _e | 287 | 57,4 | 213 | 42,6 | 136 | 27,2 | 138 | 27,6 | 127 | 25,4 | 79 | 15,8 | 7 | 1,4 |
| | Min | 171 | 34,2 | 161 | 32,2 | 78 | 15,6 | 55 | 11 | 63 | 12,6 | 33 | 6,6 | 0 | 0 |
| | Max | 339 | 67,8 | 329 | 65,8 | 232 | 46,4 | 214 | 42,8 | 227 | 45,4 | 155 | 31 | 23 | 4,6 |
| Primer ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 306,26 | 61,25 | 193,74 | 38,75 | 154,96 | 30,99 | 151,30 | 30,26 | 115,26 | 23,05 | 71,74 | 14,35 | 6,74 | 1,35 |
| | DS | 48,90 | 9,78 | 48,90 | 9,78 | 48,52 | 9,70 | 35,99 | 7,20 | 41,68 | 8,34 | 25,03 | 5,01 | 4,99 | 1,00 |
| | M _e | 309,00 | 61,80 | 191,00 | 38,20 | 150,00 | 30,00 | 153,00 | 30,60 | 109,00 | 21,80 | 68,00 | 13,60 | 6,00 | 1,20 |
| | Min | 174,00 | 34,80 | 111,00 | 22,20 | 75,00 | 15,00 | 69,00 | 13,80 | 45,00 | 9,00 | 25,00 | 5,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 389,00 | 77,80 | 326,00 | 65,20 | 281,00 | 56,20 | 222,00 | 44,40 | 221,00 | 44,20 | 143,00 | 28,60 | 25,00 | 5,00 |
| Segundo ciclo | n | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| | X | 340,56 | 68,11 | 159,44 | 31,89 | 178,19 | 35,64 | 162,37 | 32,47 | 92,63 | 18,53 | 59,63 | 11,93 | 7,19 | 1,44 |
| | DS | 48,13 | 9,63 | 48,13 | 9,63 | 63,36 | 12,67 | 48,30 | 9,66 | 32,88 | 6,58 | 19,92 | 3,98 | 7,22 | 1,44 |
| | M _e | 351,00 | 70,20 | 149,00 | 29,80 | 168,00 | 33,60 | 178,00 | 35,60 | 90,00 | 18,00 | 56,00 | 11,20 | 6,00 | 1,20 |
| | Min | 191,00 | 38,20 | 92,00 | 18,40 | 88,00 | 17,60 | 45,00 | 9,00 | 35,00 | 7,00 | 25,00 | 5,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 408,00 | 81,60 | 309,00 | 61,80 | 363,00 | 72,60 | 243,00 | 48,60 | 177,00 | 35,40 | 103,00 | 20,60 | 29,00 | 5,80 |
| Tercer ciclo | n | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | X | 361,29 | 72,26 | 138,71 | 27,74 | 184,71 | 36,94 | 176,57 | 35,31 | 78,05 | 15,61 | 54,62 | 10,92 | 6,05 | 1,21 |
| | DS | 45,03 | 9,01 | 45,03 | 9,01 | 44,55 | 8,91 | 36,45 | 7,29 | 35,95 | 7,19 | 23,25 | 4,65 | 4,95 | 0,99 |
| | M _e | 365,00 | 73,00 | 135,00 | 27,00 | 191,00 | 38,20 | 182,00 | 36,40 | 74,00 | 14,80 | 54,00 | 10,80 | 5,00 | 1,00 |
| | Min | 207,00 | 41,40 | 96,00 | 19,20 | 92,00 | 18,40 | 91,00 | 18,20 | 37,00 | 7,40 | 14,00 | 2,80 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 404,00 | 80,80 | 293,00 | 58,60 | 301,00 | 60,20 | 245,00 | 49,00 | 174,00 | 34,80 | 101,00 | 20,20 | 19,00 | 3,80 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo , Max=Máximo

Tabla XXVIII-B. Dispersión de la cromatina del espermatozoide en muestras de pacientes sin embarazo. Comparación en los diferentes ciclos de tratamiento. Estadística descriptiva.

| <i>DN :Dispersión normal</i> <i>DA: Dispersión anormal</i> | | DN de la cromatina Células | DN de la cromatina % | DA de la cromatina Células | DA de la cromatina % | Halo Grande células | Halo Grande % | Halo mediano células | Halo Mediano % | Halo Chico Células | Halo Chico % | Sin halo células | Sin halo % | Núcleo degradado células | Núcleo degradado % |
|---|----------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------|
| Basal | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 266,79 | 53,36 | 233,21 | 46,64 | 123,68 | 24,74 | 143,11 | 28,62 | 144,36 | 28,87 | 76,68 | 15,34 | 12,18 | 2,44 |
| | DS | 41,2 | 8,24 | 41,2 | 8,24 | 30 | 6 | 31,08 | 6,22 | 35,86 | 7,17 | 31,07 | 6,21 | 9,31 | 1,86 |
| | M _e | 266 | 53,2 | 234 | 46,8 | 116 | 23,2 | 139,5 | 27,9 | 140,5 | 28,1 | 73 | 14,6 | 10,5 | 2,1 |
| | Min | 161 | 32,2 | 163 | 32,6 | 80 | 16 | 81 | 16,2 | 69 | 13,8 | 23 | 4,6 | 0 | 0 |
| | Max | 337 | 67,4 | 339 | 67,8 | 202 | 40,4 | 190 | 38 | 239 | 47,8 | 138 | 27,6 | 36 | 7,2 |
| Primer ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 288,11 | 57,62 | 211,89 | 42,38 | 134,89 | 26,98 | 153,21 | 30,64 | 131,64 | 26,33 | 69,68 | 13,94 | 10,57 | 2,11 |
| | DS | 41,75 | 8,35 | 41,75 | 8,35 | 29,38 | 5,88 | 28,45 | 5,69 | 34,38 | 6,88 | 27,94 | 5,59 | 7,41 | 1,48 |
| | M _e | 286,50 | 57,30 | 213,50 | 42,70 | 132,50 | 26,50 | 151,00 | 30,20 | 129,50 | 25,90 | 65,50 | 13,10 | 8,50 | 1,70 |
| | Min | 189,00 | 37,80 | 140,00 | 28,00 | 85,00 | 17,00 | 104,00 | 20,80 | 64,00 | 12,80 | 24,00 | 4,80 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 360,00 | 72,00 | 311,00 | 62,20 | 212,00 | 42,40 | 207,00 | 41,40 | 217,00 | 43,40 | 129,00 | 25,80 | 30,00 | 6,00 |
| Segundo ciclo | n | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| | X | 313,89 | 62,78 | 186,11 | 37,22 | 146,64 | 29,33 | 167,25 | 33,45 | 116,39 | 23,28 | 61,25 | 12,25 | 8,46 | 1,69 |
| | DS | 43,05 | 8,61 | 43,05 | 8,61 | 32,87 | 6,57 | 34,56 | 6,91 | 35,08 | 7,02 | 24,96 | 4,99 | 5,89 | 1,18 |
| | M _e | 318,50 | 63,70 | 181,50 | 36,30 | 141,00 | 28,20 | 171,00 | 34,20 | 117,50 | 23,50 | 58,00 | 11,60 | 8,00 | 1,60 |
| | Min | 230,00 | 46,00 | 78,00 | 15,60 | 97,00 | 19,40 | 113,00 | 22,60 | 32,00 | 6,40 | 16,00 | 3,20 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 422,00 | 84,40 | 270,00 | 54,00 | 240,00 | 48,00 | 282,00 | 56,40 | 206,00 | 41,20 | 116,00 | 23,20 | 25,00 | 5,00 |
| Tercer ciclo | n | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | X | 334,12 | 66,82 | 165,88 | 33,18 | 161,72 | 32,34 | 172,40 | 34,48 | 106,24 | 21,25 | 52,44 | 10,49 | 7,20 | 1,46 |
| | DS | 42,84 | 8,57 | 42,84 | 8,57 | 39,06 | 7,81 | 36,01 | 7,20 | 38,23 | 7,65 | 25,39 | 5,08 | 5,17 | 1,04 |
| | M _e | 329,00 | 65,80 | 171,00 | 34,20 | 153,00 | 30,60 | 160,00 | 32,00 | 103,00 | 20,60 | 44,00 | 8,80 | 7,00 | 1,40 |
| | Min | 259,00 | 51,80 | 71,00 | 14,20 | 100,00 | 20,00 | 116,00 | 23,20 | 28,00 | 5,60 | 11,00 | 2,20 | 0,00 | 0,00 |
| | Max | 429,00 | 85,80 | 241,00 | 48,20 | 255,00 | 51,00 | 283,00 | 56,60 | 203,00 | 40,60 | 130,00 | 26,00 | 18,00 | 3,60 |

n= recuento, X=media, DS=Desviación estándar, M_e= Mediana, Min=Mínimo ,Max=Máximo